

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 56 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2557 Vol. 56 No. 3 July – September 2014

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	ภญ.จุรีภรณ์ บุญวงศ์โรจน์ นพ.วันชัย ลัตยาวุฒิพงศ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิ่มเอิบ ดร.ปนัดดา ชิลวา	พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	สพญ.ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ	
คณะบรรณาธิการ	ศ.ดร.นพ.สมชัย บวรกิตติ ศ.ดร. อรษา สุตเธียรกุล ดร.อารี ทัตติยพงศ์ นายศิริ ศรีมนโรธ นางกนกพร อธิสุข นายสุธน วงษ์ชีรี ดร.สุวรรณา เขียรอังกูร ดร.วิมล เพชรกาญจนพงศ์ ภญ.ดร.เจริญดี ปิงสุทธิวงศ์ ดร.อารีรัตน์ สง่าแสง	ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ นางสาวจุไร โชติธนาทวิวงศ์ ดร.อุษาวดี ถาวรระ นางวิชชุดา จริยะพันธ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.ประไพ วงศ์สินคงม่น ภญ.ดร.วลัยลักษณ์ เมธภัทร
เลขานุการ	นางไพรวรรณ บุญวงศ์	
ฝ่ายธุรการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงศ์	
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	หจก. อรุณการพิมพ์ 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-34	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 56 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2557

Vol. 56 No. 3 July - September 2014

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง

109

จิตรรา ชัยวัฒน์

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

ความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ

123

จิตรรา ชัยวัฒน์ จิราณัฐ แจ่มทวีกุล สันติพงศ์ วงศ์เพ็ญทักษ์ และปรัชญาพร อินทองแก้ว

การประเมินความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อมในเส้นก๋วยเตี๋ยว

135

ทนนพันธ์ สัจจปาละ ชันทอง เพ็ชรนอก ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์ และกนกวรรณ ตุ่นสกุล

การทดสอบความถูกต้องของวิธี Capillary Electrophoresis–Sodium Dodecyl Sulfate

144

เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ วิชชุดา จริยะพันธุ์ และสายวรุฬ จตุรกิตตินันท์

คำร้อยละสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงในการประเมินคุณภาพภายนอกระดับชาติของ

158

ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ประเทศไทย พ.ศ. 2551 - 2556

สุภาวัลย์ ปิยรัตน์วรสกุล และชมโฉไล สันธุสาร

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 56 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2557

Vol. 56 No. 3 July - September 2014

CONTENTS

Page

Original Articles

- Physico-chemical Identification of THIAN DAENG** 109

Chitra Chaiyawat

Laboratory Findings

- Safety of herbal medicines in the National List of Essential Medicines** 123

*Chitra Chaiyawat Jiranuch Jamtaweekul Santipong Wongpentak
and Prachyaporn Inthongkaew*

- Risk Assessment of Light Filth in Rice Noodle** 135

*Tanongpan Satjapala Kuntong Pednog Kokeiat Sarttarin
and Kanogwan Toonsakool*

- Method validation of Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl** 144

- Sulfate for Identity and Purity analysis of Monoclonal Antibodies**

Titaporn Pootipinyowat Wichuda Jariyapan and Saiwarul Jadoonkittinan

- The percent CCV from National External Quality Assessment** 158

- of Clinical Chemistry laboratory in Thailand, 2008-2013 Experience**

Supawan Piyanavarnsakul and Chomchilai Sinthusarn



บทบรรณาธิการ



สวัสดีผู้อ่านวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่าน เล่มนี้เป็นปีที่ 56 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2557 มีบทความที่น่าสนใจทั้งหมด 5 เรื่อง มีเรื่องเกี่ยวกับยาสมุนไพร 2 เรื่อง ได้แก่ การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง เนื่องจากเทียนแดงเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งในเทียนทั้งเก้าซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยาแผนโบราณ แต่พบว่ามีข้อมูลด้านคุณภาพทางเคมีไม่เพียงพอสำหรับการจัดทำมาตรฐานในตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย ผู้พิมพ์จึงได้ดำเนินการศึกษาในครั้งนี้ ส่วนเรื่องที่ 2 ความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติเป็นการสำรวจยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติตามโครงการประกันคุณภาพยาสมุนไพรที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐเพื่อให้ได้ข้อมูลการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ในสมุนไพรกลุ่มดังกล่าว เรื่องที่ 3 การประเมินความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อมในเส้นก๋วยเตี๋ยว เป็นการสำรวจสิ่งแวดล้อมขนาดเล็กที่น่ารังเกียจ มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เช่น ชิ้นส่วนของแมลง หนอน ชนบก และอื่นๆ ในเส้นก๋วยเตี๋ยวที่ผลิตขายในท้องตลาด ซึ่งข้อมูลการสำรวจครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาขั้นตอนการผลิตก๋วยเตี๋ยวที่มีคุณภาพต่อไป เรื่องที่ 4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุประเภทโมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับสินค้าที่ดีและมีคุณภาพ และสุดท้ายเรื่อง คำร้อยละสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงในการประเมินคุณภาพภายนอกระดับชาติของห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ประเทศไทย พ.ศ. 2551-2556 มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพัฒนาและดำรงไว้ซึ่งการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสากลอย่างต่อเนื่อง บทความทั้ง 5 เรื่องที่กล่าวมาข้างต้นมีรายละเอียดและข้อมูลที่น่าสนใจและน่าติดตามอย่างยิ่ง

ในฉบับนี้ขอแจ้งข่าวดีให้ผู้อ่านและผู้ส่งบทความได้ทราบทั่วกันว่า การจัดทำวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นับจากฉบับนี้เป็นต้นไป เราได้นำระบบบริหารคุณภาพ ISO 9001:2008 มาใช้ในการดำเนินงาน โดยมีขั้นตอนและระยะเวลาการดำเนินการที่กำหนดไว้ใน Quality Procedure (QP) ซึ่งนับเป็นหนึ่งในหลายกระบวนการดำเนินงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ผ่านการรับรองจาก United Registrar of Systems (Thailand) Limited (URS) ตั้งแต่วันที่เดือนกันยายนปีนี้ ทั้งนี้ความสำเร็จในการพัฒนาระบบบริหารคุณภาพ ISO 9001:2008 เกิดจากนโยบายของอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นายแพทย์อภิชัย มงคล และการสนับสนุนจากรองอธิบดีทั้ง 3 ท่าน รวมทั้งความมุ่งมั่นของทีมงาน จึงขอฝากความมั่นใจกับผู้ส่งบทความและผู้อ่านทุกท่านว่าวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นอกจากจะมีคุณภาพเชิงวิชาการแล้วเรายังได้นำระบบบริหารคุณภาพ ISO 9001:2008 มาใช้ในการดำเนินงานตามที่กล่าวแล้ว

ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ

บรรณาธิการ

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง

จิตรรา ชัยวัฒน์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ เทียนแดง คือเมล็ดแก่แห้งของ *Lepidium sativum* L. (Garden Cress) ใช้ผสมในยาแผนโบราณที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยมากกว่า 80 ตำรับ ได้ศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีและฟิสิกส์ของเทียนแดง พบว่าการทดสอบต่อไปนี้สามารถใช้ตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีและฟิสิกส์ของเทียนแดงได้ คือ การพองตัวของ Mucliage เมื่อถูกน้ำและเกิดสีกับ ruthenium red TS, การทำปฏิกิริยาเกิดสีกับ dilute nitric acid, sodium hydroxide TS และ ninhydrin TS, การทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนกับ acetic potassium iodobismuthate TS, การทดสอบอนุมูล cyanide และ sulfide โดยวิธี paper strip และการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดกับสารมาตรฐาน sinapic acid นอกจากนี้ตามที่มีรายงานระบุว่าพบ lepidine ในเทียนแดง จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงกับ lepidine ปรากฏว่าไม่พบ lepidine ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา และในรายงานที่พบสารชื่อ lepidine นั้น แสดงสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวเป็นกลุ่ม imidazole alkaloid ซึ่งมีสูตรโครงสร้างแตกต่างจาก lepidine ที่ปรากฏใน Merck index

บทนำ

เทียนทั้งเก้า คือ เทียนขาว เทียนดำ เทียนแดง เทียนขาวเปลือก เทียนตาตักแตน เทียนยาวพาดิ เทียนสัตตบุษย์ เทียนตากบ และเทียนเกล็ดหอย เป็นสมุนไพรที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อจัดทำมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) และเป็นสมุนไพรที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมผลิตยาแผนโบราณ เทียนแดงที่โบราณใช้ทำยามีสรรพคุณแก้เสมหะ ลม และดีระคนกันซึ่งเรียกว่าสันนิบาต แก้ลมเสียดแทงในลำไส้ แก้ลมคลื่นเหียน โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรเทียนชนิดอื่นในพิภักเทียนทั้งห้าและเทียนทั้งเก้า ซึ่งสรรพคุณโดยรวมมีรสขม ทำให้ร่างกายอยู่ในสมดุล คือไม่ร้อนหรือเย็นเกินไป⁽¹⁾

เทียนแดงเป็นเครื่องยาที่มีการพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดทำข้อมูลทางเภสัชเวท⁽²⁾ จากเมล็ดแก่แห้งของพืชที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Lepidium sativum* L. ในวงศ์ Cruciferae (Brassicaceae) มีชื่อสามัญว่า Garden Cress⁽³⁾ เป็นพืชพื้นเมืองของเอเชียตะวันตกและแพร่ไปสู่ประเทศทางยุโรปตะวันตก เมล็ดเทียนแดงที่จำหน่ายตามร้านขายยาสมุนไพรในประเทศไทยเป็นสมุนไพรนำเข้าจากต่างประเทศ ข้อมูลการนำเข้าสมุนไพรที่ได้รับการควบคุมดูแลจากสำนักงานศุลกากรนำเข้าท่าเรือกรุงเทพ แจ้งว่าประเทศที่ผลิตสินค้าคือ ปากีสถาน อินเดีย และอัฟกานิสถาน พืชที่ให้เมล็ดเทียนแดงเป็นพืชขนาดเล็ก อายุ 1 ปี ดอกเป็นช่อ ออกรวมกันเป็นกระจุกที่ปลายยอดในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม ดอกมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 3-5 มิลลิเมตร สมบูรณ์เพศ สีม่วงอ่อน ผลแบบผลฝักกด เมื่อสุกแตกเป็นสองแฉกยึดติดกันด้วยแกนที่ติดตั้ง ไข่ลักษณะคล้ายปีกแยกไปทั้งสองข้าง เมล็ดมีสีน้ำตาลขนาดเล็กคล้ายรูปไข่ ผิวมันลื่น เรียบ ไม่มีขน ปลายข้างหนึ่งเรียวยาวมีลักษณะเป็นร่องตามแนวสันๆ เปลือกเมล็ดจะพองตัวเมื่อถูกความชื้น⁽²⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เมล็ดเทียนแดง

จากงานวิจัยที่ศึกษาตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงที่จำหน่ายในประเทศไทย ยังให้ข้อมูลด้านคุณภาพทางเคมีไม่เพียงพอสำหรับการจัดทำมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ได้ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะตัวและรายงานการวิจัยที่พบสารประกอบในเมล็ดเทียนแดงระบุว่า มี edible oil สูงถึงร้อยละ 58⁽³⁾ และพบสารประกอบต่างๆ เช่น benzyl cyanide, benzyl isothiocyanate, allyl glucosinolate, amino acids, sinapic acid, sinapine และ lepidine^(2, 4, 5) เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเมล็ดเทียนแดงโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารประกอบในเมล็ดเทียนแดงกับสารเคมีที่เติมลงไปทำปฏิกิริยาเพื่อพิสูจน์ว่ามีสารประกอบชนิดนั้น

อยู่จริง ซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีดังกล่าวจะเฉพาะเจาะจงกับสารประกอบที่มีในเมล็ดเทียนแดง เช่น ปฏิกิริยาการทำให้เกิดสี การทำให้เกิดการตกตะกอน นอกจากนี้วิธีการตรวจเอกลักษณ์ของเมล็ดเทียนแดงโดย Thin-layer Chromatography (TLC) ที่มีผู้รายงานไว้แล้วนั้น^(2, 7) ยังไม่มีสารสำหรับเปรียบเทียบค่า Rf จึงได้ศึกษาสารประกอบในเมล็ดเทียนแดงที่อาจนำมาใช้เป็นสารเปรียบเทียบ (marker) เพื่อนำข้อมูลผลการทดสอบไปประกอบการพิจารณาในหัวข้อการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดงเพื่อบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสมุนไพร

เมล็ดแก่แห้งของเทียนแดงจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งจากร้านขายส่งและขายปลีกสมุนไพร ในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 10 ตัวอย่าง และในส่วนภูมิภาคจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ชลบุรี ขอนแก่น และสงขลา จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างได้ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทว่ามาจากพืชชื่อ *Lepidium sativum* L. ในวงศ์ Cruciferae (Brassicaceae), Crude Drug Number: DMSc 431

เครื่องมือและอุปกรณ์

- Electronic analytical balance, A&D รุ่น ER180A
- Thin-layer Chromatography Apparatus : TLC tank, silica gel GF254 precoated plate, microcapillary tube ขนาด 2, 5, 10 ไมโครลิตร
- เครื่องถ่ายภาพโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง บริษัท CAMAG
- อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น กระจกตวงกรวยแยก ปิเปต กระดาษกรอง water bath และ centrifuge tube เป็นต้น

สารมาตรฐาน

- lepidine ($C_{10}H_9N$) ความบริสุทธิ์ >97% GC, Fluka Chemie AG Switzerland
- sinapic acid ($C_{11}H_{12}O_5$) ความบริสุทธิ์ >99% GC, Fluka Chemie AG Switzerland

สารเคมี (AR grade)

ethanol, methanol, ruthenium red, nitric acid, sodium hydroxide, sulfuric acid, zinc powder, iron (III) chloride, iron (II) sulfate, hydrochloric acid, ninhydrin, petroleum ether ($40^\circ - 60^\circ$), chloroform, ethyl acetate, ammonia solution, iodine, chloroplatinic acid, potassium iodide, bismuth oxynitrate, glacial acetic acid

น้ำยาทดสอบ

Ruthenium red TS, acetic potassium iodobismuthate TS, sodium hydroxide TS, iron (II) sulfate TS, dilute nitric acid, 10% w/v sodium hydroxide, 6M hydrochloric acid, iron (III) chloride TS, ninhydrin TS, anisaldehyde TS, dragendorff TS, lodoplatinate TS.

วิธีเตรียมน้ำยาทดสอบ

เตรียมน้ำยาทดสอบ (Test Solution, TS) ตามวิธีที่ระบุใน Thai Pharmacopoeia^(8, 9)

วิธีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์

1. การทดสอบ **mucilage**⁽⁹⁾

ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในกระบอกตวงที่มีจุลปิดขนาด 25 มิลลิลิตร ทำให้ตัวอย่างเปียกทั่วกันด้วย ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำจนครบ 25 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าแรงๆ 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว เติม ruthenium red TS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

2. การทดสอบปฏิกิริยากับ **acetic potassium iodobismuthate TS**⁽¹⁰⁾

ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียดน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ใน centrifuge tube เติม ethanol 3 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่านาน 3 นาทีแล้วกรอง สารละลายที่กรองได้เติม acetic potassium iodobismuthate TS 2-3 หยด

3. การทดสอบปฏิกิริยากับกรดและด่าง

3.1 ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียดน้ำหนัก 0.1 กรัม เติม dilute nitric acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทำให้อุ่นบน water bath

3.2 ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 0.1 กรัม เติม sodium hydroxide TS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. การทดสอบอนุมูล **sulfide** และ **cyanide** โดยวิธี **paper strip**^(11, 12)

เตรียม iron (II) sulfate strip โดยนำกระดาษกรองขนาดกว้าง 2-3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ชุบ iron (II) sulfate TS ทำให้แห้ง แล้วชุบซ้ำในสารละลาย 10% w/v sodium hydroxide ทำให้แห้งอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำมาใช้ทันที โดยสอดไว้ในหลอดแก้วซึ่งติดอยู่กับจุกยาง

ใส่ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียดน้ำหนัก 5 กรัม ลงในขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร เติมผงสังกะสี 3 กรัม และ dilute sulfuric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วปิดจุกยางที่มีหลอดแก้วและ iron (II) sulfate strip สอดอยู่ทันที (ภาพที่ 2) เขย่าเบาๆ ให้เมล็ดเทียนแดงบดละเอียด ผงสังกะสี และ dilute sulfuric acid เข้ากัน แล้วนำไปวางบน water bath โดยเปลี่ยน paper strip ทุกๆ 15 นาที และค่อยๆ หยดน้ำยาที่ประกอบด้วย 6M hydrochloric acid 1 มิลลิลิตร และ iron (III) chloride TS 2-3 หยดลงบน paper strip ที่นำออกมาจากหลอดที่เวลาประมาณ 45 นาที (ทำใน hood)



ภาพที่ 2 ขวดบรรจุตัวอย่างและหลอดแก้วทดสอบพร้อม paper strip

5. การทดสอบปฏิกิริยากับ ninhydrin TS

ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 0.5 กรัม ใส่ใน centrifuge tube เติม ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่านาน 5 นาที กรองด้วยสำลี นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติม ninhydrin TS 2 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้ร้อนใน water bath เป็นเวลา 2-3 นาที

6. Thin-layer Chromatographic Test

สารละลายมาตรฐาน

- sinapic acid: ละลาย sinapic acid น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร เติม methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- lepidine: ปิเปต lepidine 10 ไมโครลิตร เติม methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลายตัวอย่าง

1. ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 1 กรัม เติม ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่านาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน สารละลายส่วนใสนำไปทดสอบต่อในข้อ 6.1 และ 6.2

2. ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 5 กรัม ใส่ในกรวยแยก เติม petroleum ether (40° - 60°) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แยกชั้น petroleum ether ออก นำไปดำเนินการต่อตามวิธีในข้อ 3 ส่วนกากนำไปสกัดด้วย methanol 2 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร แต่ละครั้งกรองแล้วนำสารสกัดที่ได้มารวมกัน นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย dilute hydrochloric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่กรวย แยกสกัดด้วย ethyl acetate 2 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร รวมชั้น ethyl acetate นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง A) ชั้น aqueous ทำให้เป็นด่างด้วย ammonia TS และสกัดด้วย chloroform 2 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร รวมชั้น chloroform นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง B)

3. ชั้น petroleum ether จากข้อ 2 นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง C)

4. ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 5 กรัม เติมสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน สกัดด้วย petroleum ether (40° - 60°) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แยกชั้น petroleum ether ออก นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง D)

6.1 การทดสอบด้วยทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol และใช้น้ำยาแยก toluene : ethyl acetate (9:1)

นำสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัตวประกอบด้วย toluene : ethyl acetate (9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ผึ่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบด้วยน้ำยาฟอสฟอรัส anisaldehyde TS แล้วอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

6.2 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol และใช้น้ำยาแยก acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1)

นำสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัตวประกอบด้วย acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาเคลื่อนที่

ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบด้วย น้ำยาฟันทัน anisaldehyde TS แล้วอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทัน dragendorff TS

6.3 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid และใช้น้ำยาแยก chloroform : methanol (9:1)

นำสารละลายมาตรฐาน sinapic acid ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่าง A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัลชันประกอบด้วย chloroform : methanol (9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบโดยอ้อมของ iodine ทำการทดสอบต่อโดยการสกัดสาร จากจุด (spot) ที่ Rf value ตรงกับ sinapic acid ด้วย methanol แล้วเปรียบเทียบ ultraviolet spectrum ของสารสกัดดังกล่าวกับสารมาตรฐาน sinapic acid

6.4 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลาย ตัวอย่าง B) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine และใช้น้ำยาแยก chloroform : methanol : ammonia (90:9:1)

นำสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 และสารละลายตัวอย่าง B ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 ให้เป็นแถบยาว ประมาณ 2 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัลชันประกอบด้วย chloroform : methanol : ammonia (90:9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาแยกเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบโดยฟันทันด้วยน้ำยา iodoplatinate TS

6.5 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลาย ตัวอย่าง C และ D) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine และใช้น้ำยาแยก chloroform : methanol : ammonia (90:9:1)

นำสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่าง C ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัลชันประกอบด้วย chloroform : methanol : ammonia (90:9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาแยกเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบโดยฟันทันด้วยน้ำยา iodoplatinate TS

ผล

1. การทดสอบ mucilage เกิดการพองตัวของ mucilage และเมื่อเติม ruthenium red TS mucilage จะเป็นสีชมพู

2. การทดสอบปฏิกิริยากับ acetic potassium iodobismuthate TS เกิดตะกอนสีส้ม

3. การทดสอบปฏิกิริยากับกรดและด่าง

3.1 การทดสอบปฏิกิริยากับ dilute nitric acid เกิดสีน้ำตาลแดง และเมื่อทำให้ร้อนต่อไปสีน้ำตาลแดง จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3.2 การทดสอบปฏิกิริยากับ sodium hydroxide TS เกิดสีเหลืองขึ้นทันที

4. การทดสอบอนุมูล cyanide และ sulfide เกิดสีดำบน strip และ strip ที่นำออกมาจากหลอดที่เวลา 45 นาที เมื่อค่อยๆ หยดน้ำยาที่ประกอบด้วย 6M hydrochloric acid 1 มิลลิลิตร และ iron (III) chloride TS 2-3 หยด ลงบน strip สีดำ บน strip จะหายไปพร้อมกับเกิดฟองก๊าซและมีกลิ่น hydrogen sulfide และเกิดสีน้ำเงิน หรือสีเขียวที่ปลาย strip

5. การทดสอบปฏิกิริยากับ ninhydrin TS เกิดสีม่วงน้ำเงิน

6. Thin-layer Chromatographic Test

6.1 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol โดยใช้ น้ำยาแยก toluene : ethyl acetate (9:1) พบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 6 ตำแหน่ง (ภาพที่ 3)

6.2 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol โดยใช้ น้ำยาแยก acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1) เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS สารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงพบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 4 ตำแหน่ง และตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น dragendorff TS สารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงพบจุดสีม่วง 1 ตำแหน่ง และจุดสีเหลืองเข้มบนพื้นสีเหลืองจำนวน 4 ตำแหน่ง ไม่พบจุดสีส้มที่ตำแหน่งตรงกับ lepidine (ภาพที่ 4)

6.3 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid ใช้ น้ำยาแยก chloroform : methanol (9:1) เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่ามีจุดที่บ่งชี้ตำแหน่งตรงกับสารมาตรฐาน sinapic acid (ภาพที่ 5) และให้สีน้ำตาลอมชมพูกับไอของ iodine เหมือนกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid (ภาพที่ 6) และ ultraviolet spectrum ของสารสกัดจากจุดดังกล่าวมี maximum absorption ที่ 310 นาโนเมตร ตรงกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS



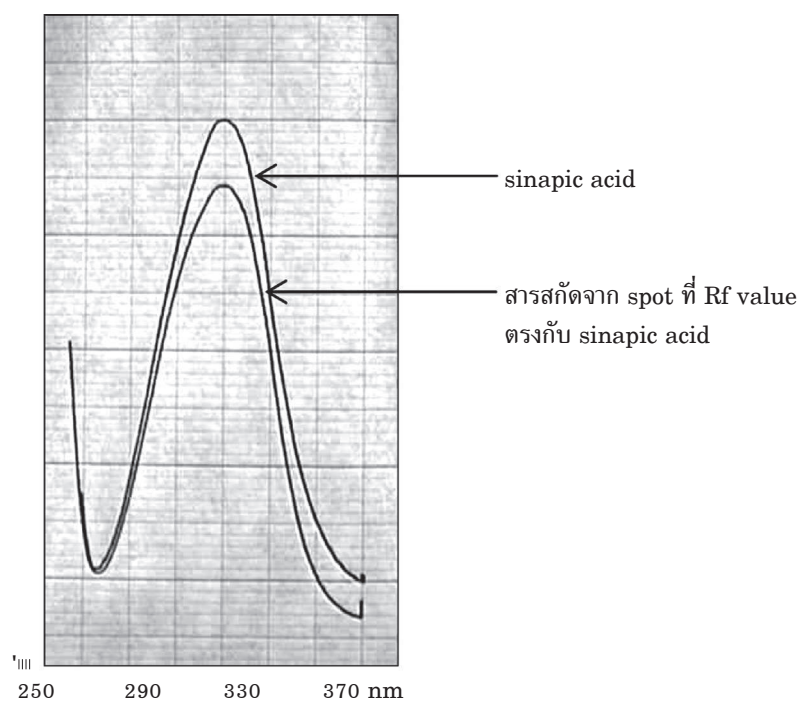
ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS (ทางซ้ายมือ) และน้ำยาพ่น dragendorff TS (ทางขวามือ)



ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง A) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร



ภาพที่ 6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง A) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid ตรวจสอบโดยการอ้งไอของ iodine



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบ Ultraviolet spectrum ระหว่าง sinapic acid และสารสกัดจาก spot ที่ Rf value ตรงกับ sinapic acid ในสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง

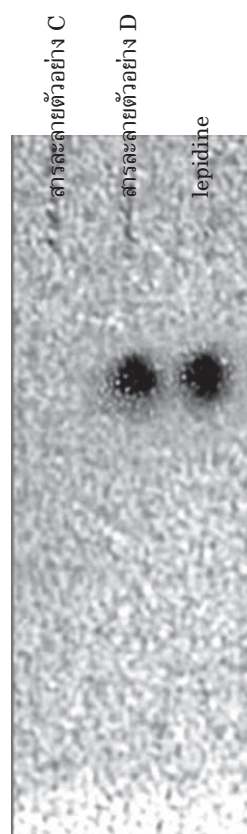
6.4 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง B) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ไม่พบจุดที่ตำแหน่งตรงกับ lepidine (ภาพที่ 8)

6.5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง C) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ไม่พบจุดที่ตำแหน่งตรงกับ lepidine (ภาพที่ 9)

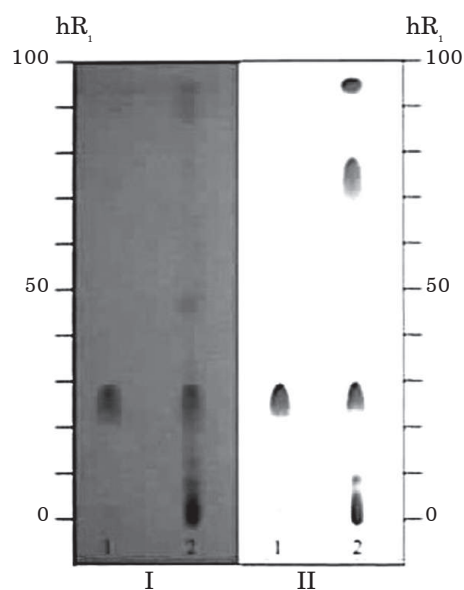
6.6 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (acid fraction) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid โดยใช้ยาแยกที่มีส่วนผสมของ chloroform และ methanol อัตราส่วน 9:1 (ภาพที่ 10) และค่า R_f ที่แสดงไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia Volume III, 2009) ตารางที่ 1



ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง B) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทิโอดิโพลาทิเนต TS



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง C และ D) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทิโอดิโพลาทิเนต TS



ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน sinapic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (acid fraction) โดยใช้ยาแยกที่มีส่วนผสมของ Chloroform และ Methanol อัตราส่วน 9:1

- 1 = สารละลายมาตรฐาน sinapic acid
 2 = สารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (acid fraction)
 I = ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
 II = อังไอ iodine

ตารางที่ 1 แสดงค่า hRf ของสารสกัดเมล็ดเทียนแดง *Lepidium sativum* L.

จุด	ค่า hRf	การตรวจสอบ	
		แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร	ตรวจสอบด้วยไอ Iodine
1	7-9	ทึบแสง	สีน้ำตาล
2	12-13	ทึบแสง	-
3*	27-29	ทึบแสง	สีน้ำตาลอมชมพู
4	42-44	-	สีเหลืองอ่อน
5	45-47	ทึบแสง	-
6	75-77	ทึบแสง	สีน้ำตาล
7	86-88	ทึบแสง	สีเหลืองอ่อน
8	94-97	ทึบแสง	สีน้ำตาล

*sinapic acid

วิจารณ์

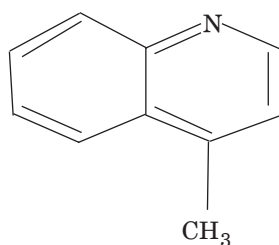
จากข้อมูลทางเภสัชเวทผิวของเทียนแดงประกอบด้วย mucilaginous cells ผลการทดสอบพบว่า mucilage ของเทียนแดงจะเกิดการพองตัวเมื่อถูกกับน้ำ และทำปฏิกิริยากับ ruthenium red TS ให้สีชมพู สารอื่นๆ ที่มีรายงานว่าพบในเทียนแดง เช่น สารประกอบในกลุ่ม alkaloids จะทำปฏิกิริยากับ acetic potassium iodobismuthate TS เกิดเป็นตะกอนสีส้มและสารกลุ่ม isothiocyanate ซึ่งจะแตกตัวให้อนุมูล sulfide และ cyanide ทำการทดสอบโดยใช้ paper strip ถ้าเป็นอนุมูล sulfide จะเกิดสีดำที่เกิดขึ้นบน strip ตั้งแต่ 5 นาทีแรกเท่านั้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของอนุมูล sulfide และ sodium hydroxide และ iron (II) sulfate ที่ซึบอยู่บน strip เกิดเป็น iron (II) sulfide เมื่อถูกกรด จึงให้แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีกลิ่นเฉพาะ ส่วนอนุมูล cyanide จะทำปฏิกิริยากับ sodium hydroxide, iron (II) sulfate, iron (III) chloride TS และ hydrochloric acid (Prussian Blue Test) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงินที่ปลาย strip และจะพบบน strip เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 45 นาที ในการทดสอบจึงต้องเปลี่ยน strip ทุก 15 นาที เพื่อให้มี iron (II) sulfate เพียงพอสำหรับทำปฏิกิริยากับอนุมูล cyanide การเกิดสีเขียวหรือสีน้ำเงินขึ้นอยู่กับปริมาณ cyanide ที่มีในตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างมีปริมาณ cyanide น้อยจะได้สีเขียว ถ้าตัวอย่างมีปริมาณ cyanide มากจะได้สีน้ำเงิน นอกจากนี้สารประกอบในเทียนแดงยังทำปฏิกิริยากับ dilute nitric acid เกิดสีน้ำตาลแดง และทำปฏิกิริยากับ ninhydrin TS เกิดสีม่วง น้ำเงิน อาจเกิดจากองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนซึ่งพบเป็นปกติในเมล็ดพืช

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดงโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) พบว่าลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol โดยใช้ น้ำยาแยก toluene : ethyl acetate (9:1) เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS พบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 6 ตำแหน่ง ส่วนน้ำยาแยก acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1) เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS พบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้บอกลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงได้ ในกรณีที่ไม่มีการมาตรฐานเปรียบเทียบ

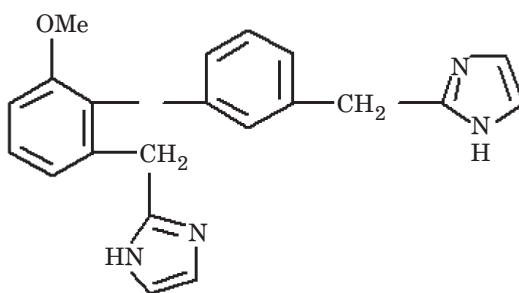
เนื่องจากในเมล็ดเทียนแดงมีปริมาณ edible oil สูง การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) จึงเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการสกัด edible oil ออกก่อนด้วย petroleum ether (40° - 60°) แล้วสกัดตัวอย่างต่อเนื่องนำ acid fraction และ basic fraction ไปทดสอบว่าในเมล็ดเทียนแดงมีสารประกอบ sinapic acid และ lepidine อยู่หรือไม่ โดยการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดใน acid fraction กับสารมาตรฐาน sinapic acid และสารสกัดใน basic fraction กับสารมาตรฐาน lepidine จากการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดใน acid fraction กับสารมาตรฐาน sinapic acid พบว่าเมื่อตรวจสอบโดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สารสกัดของเมล็ดเทียนแดงพบจุดที่บ่งแสงที่มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน sinapic acid และให้สีน้ำตาลปนชมพูเมื่ออ้อมไอของ iodine เช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid เมื่อนำจุดดังกล่าวมาทดสอบต่อโดยการสกัดด้วย methanol และนำไป scan ด้วย UV spectrophotometer พบว่าจุดดังกล่าวมี maximum absorption ที่ 310 nm ตรงกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid แสดงว่าสามารถใช้ sinapic acid เป็นสารเปรียบเทียบ (marker) ในการตรวจเอกลักษณ์เมล็ดเทียนแดงโดย Thin-layer Chromatography ได้ส่วนการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงใน basic fraction กับสารมาตรฐาน lepidine ปรากฏว่าไม่พบ lepidine ในสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงตามรายงานที่ระบุว่าตรวจพบ alkaloids 7 ชนิดในเมล็ดเทียนแดง⁽⁶⁾ แถบที่ติดสีน้ำตาลกับ iodoplatinate TS อาจเป็น alkaloids ชนิดอื่นที่พบในเมล็ดเทียนแดง

จากคุณสมบัติของ lepidine ที่ละลายใน petroleum ether (40° - 60°) ในการทดสอบได้เติมสารมาตรฐาน lepidine ลงในตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด แล้วทำการสกัดด้วย petroleum ether (40° - 60°) โดยทดสอบควบคู่กันไปกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารดังกล่าว ผลการศึกษาไม่พบ lepidine ในตัวอย่างที่ศึกษา ในรายงานที่ระบุว่าในเมล็ด

เทียนแดงมี lepidine นั้นระบุว่าเป็น imidazole alkaloid lepidine^(6, 14) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างแตกต่างจากสูตรโครงสร้างของ lepidine (4-methylquinoline) ที่ปรากฏใน Merck Index⁽¹³⁾ แต่ผู้ที่อ้างงานวิจัยนี้ต่อมาได้ตัดคำ imidazole alkaloid ออก เหลือแต่ lepidine จึงทำให้เกิดการเข้าใจผิดได้สูตรโครงสร้างของ lepidine (4-methylquinoline) และ imidazole alkaloid lepidine รูปที่ 11 และ 12 ข้อมูลผลการทดสอบทางเคมี-ฟิสิกส์ที่ทำการศึกษานี้จะนำไปประกอบการพิจารณาในหัวข้อการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเมล็ดเทียนแดง เพื่อบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป



ภาพที่ 11 สูตรโครงสร้างของ lepidine (4- methylquinoline) ตามที่ปรากฏใน Merck Index⁽¹³⁾



ภาพที่ 12 สูตรโครงสร้างของ lepidine ในเทียนแดงเป็น imidazole alkaloid^(6, 14)

สรุป

วิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง โดยทำให้เกิดการฟองตัวของ mucilage เมื่อถูกน้ำและเกิดสีชมพูกับ ruthenium red TS, การทำปฏิกิริยาเกิดสีกับ dilute nitric acid, sodium hydroxide TS และ ninhydrin TS, การทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนกับ acetic potassium iodobismuthate TS, การทดสอบอนุมูล cyanide และ sulfide โดยวิธี paper strip และการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดกับสารมาตรฐาน sinapic acid สามารถใช้เป็นวิธีตรวจเอกลักษณ์ของสมุนไพรเทียนแดงได้ และในตัวอย่างที่นำมาศึกษาไม่พบ lepidine ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น 4-methylquinoline

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวสุภาภรณ์ สันธูณิชย์ ที่เป็นผู้ช่วยในการทดสอบวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง

เอกสารอ้างอิง

1. ชุนโสภิตบรรณลักษณ์. คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 1. พระนคร: สมาคมเภสัชและอายุรเวชโบราณแห่งประเทศไทย วัดสามพระยา; 2505. หน้า 45.
2. ประนอม เดชวิศิษฐ์สกุล, ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ. การพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดทำข้อมูลจำเพาะทางเภสัชเวชของเทียนทั้ง 9 [วิทยานิพนธ์ดีเด่น ปีการศึกษา 2537]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2537. หน้า 211-29
3. Plants For A Future Database. *Lepidium sativum*. [online]. 2002; [cited 2002 May 2]; [4 screen]. Available from: URL: http://www.comp.leeds.ac.uk/cgi-bin/pfaf/arr_html?Lepidium+sativum&CAN=LATIND
4. Gil V, MacLeod AJ. Studies on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* seed extracts. *Phytochemistry* 1980; 19(7): 1369-74.
5. นันทวัน บุญยะประภัศร, บรรณาธิการ. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน 2. กรุงเทพฯ: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2541: 403-6.
6. Maier UH, Gundlach H, Zenk MH. Seven imidazole alkaloids from *Lepidium sativum*. *Phytochemistry* 1998; 49(6): 1791-5.
7. Jewwachdamrongkul Y, Dechatiwongse T, Pecharaply D, Bansiddhi J, Kanchanapee P. Identification of Some Thai Medicinal Plants. *Mahidol University J Pharm Sci* 1982; 9(3): 65-73.
8. Department of Medical Sciences. Thai pharmacopoeia Vol. 1 Part 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 1987.
9. Department of Medical Sciences. Thai pharmacopoeia Vol. 1 Part 2. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 1997.
10. Curry A. Poison detection in human organs. 2nd ed. Springfield: Charles C. Thomas; 1969. p. 47-9.
11. เกริก รัตอามา, กิจชัย ศิริวัฒน์, วิไลวรรณ ต้นจ้อย. คู่มือการตรวจสอบสารพิษอย่างง่าย. กองพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2531. หน้า 51.
12. The Merck Index. 7th ed. New Jersey: Merck & Co., Inc.; 1989. p. 321.
13. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. *J Pharm Sci* 1966; 55(3): 225-76.
14. Shukla A, Singh CS, Bigoniya P. Phytochemical and CNS activity of *Lepidium sativum* Linn. seeds total alkaloid. *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre* 2011; 3(2): 226-37.

Physico-chemical Identification of THIAN DAENG

Chitra Chaiyawat

*Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences. Tiwanond Road, Nonthaburi 11000
Thailand.*

ABSTRACT THIAN DAENG is the dried mature seed of *Lepidium sativum* L. (Garden Cress). It has been prescribed in over 80 traditional medicines registered in Thailand. Various chemical identification tests have been conducted and the following tests were found applicable as methods for identification of THIAN DAENG: swelling test of mucilage in water; color tests with ruthenium red, with nitric acid, with sodium hydroxide, and with ninhydrin; precipitation test with acetic potassium iodobismuthate; tests for cyanide and sulfide ions using paper strip method; and Thin-layer chromatographic fingerprint of THIAN DAENG extract compared to that of sinapic acid. To confirm the presence of lepidine in THIAN DAENG as reported in the previous studies, the Thin-layer chromatography technique was applied. By comparing the chromatogram of the sample extract with that of lepidine, it showed that lepidine was absent in the studied samples. It was also found that the chemical structure of lepidine reported in the previous studies belonged to imidazole alkaloid group which was different from the chemical structure of lepidine existing in Merck index.

Key words: THIAN DAENG, Lepidine, Physico-chemical Identification

ความปลอดภัยของยาจากสมุนไพร ในบัญชียาหลักแห่งชาติ

จิตรา ชัยวัฒน์ จิราบุช แจ่มทวีกุล สันติพงศ์ วงศ์เพ็ญทักษ์ และปรัชญาพร อินทองแก้ว
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ เป็นยาที่กระทรวงสาธารณสุขส่งเสริมให้มีการใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ยาเพื่อป้องกันโรคหรือรักษาผู้ป่วยและทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ในปีงบประมาณ 2555-2556 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดำเนินโครงการประกันคุณภาพยาจากสมุนไพรที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐ โดยศึกษาความปลอดภัยด้านการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ในตำรับยาจากสมุนไพรกลุ่มยาแก้ไอ ยารักษาอาการทางระบบไหลเวียนโลหิต ยารักษาอาการระบบทางเดินหายใจ ยารักษาอาการทางระบบทางเดินอาหาร ยาบรรเทาอาการท้องเสีย ยารักษาอาการทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ยารักษาอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูก ได้แก่ ยาเขียวหอม ยาจันทร์ลีลา ยาแก้ไอห้ารส ยาหอมเทพจิตร ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ ยาประสะมะแว้ง ยาธาตุบรรจบ ยาเหลืองปิดสมุทร ยาประสะไพล และยาสหัสธารา การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ใช้วิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชัน สเปกโตรโฟโตเมตรี และวิธีตามตำรายาของประเทศไทยตามลำดับ โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ผลการศึกษาพบว่ายาจากสมุนไพรจำนวน 156 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนโลหะหนักสูงกว่ามาตรฐานร้อยละ 3.8 ในยา 4 ตำรับ ได้แก่ ยาเขียวหอม ยาหอมนวโกฐ ยาแก้ไอ 5 รส และยาประสะมะแว้ง การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพร 116 ตัวอย่าง ตรวจพบผิดมาตรฐานร้อยละ 25.9 ในยา 7 ตำรับ ได้แก่ ยาจันทร์ลีลา ยาแก้ไอห้ารส ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ ยาธาตุบรรจบ ยาประสะไพล และยาสหัสธารา ตำรับที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ ยาหอมเทพจิตร และยาเหลืองปิดสมุทร

บทนำ

การใช้ยาสมุนไพรในการบรรเทาอาการหรือโรคตามหลักการแพทย์แผนไทยมุ่งเน้นที่การปรับสมดุลของธาตุ เพื่อช่วยเสริมให้ร่างกายปรับเข้าสู่ภาวะปกติได้เร็วขึ้น คณะกรรมการแห่งชาติด้านยาได้คัดเลือกยาจากสมุนไพรที่มีข้อบ่งใช้ชัดเจนและมีหลักฐานทางวิชาการสนับสนุนเพียงพอ บรรจุเข้าในบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยกระทรวงสาธารณสุขได้ส่งเสริมให้มีการใช้เพิ่มขึ้นในโรงพยาบาลของภาครัฐ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ยารักษาโรคและทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ยาจากสมุนไพรดังกล่าว ได้แก่ ยากลุ่มยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ ซึ่งเป็นยาที่มีการใช้ตามองค์ความรู้ดั้งเดิมตามหลักการแพทย์และเภสัชกรรมไทย หรือตามตำราแผนไทยและยาแผนไทยประยุกต์ที่ได้รับอนุมัติทะเบียนตำรับยาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กลุ่มยาพัฒนาจากสมุนไพรแผนปัจจุบันที่มีประสิทธิผลตามสรรพคุณที่ระบุในตำรายาและมีหลักฐานทางวิชาการที่ยืนยันความปลอดภัย และกลุ่มเภสัชตำรับโรงพยาบาลจากสมุนไพร ซึ่งเป็นตำรับยาจากสมุนไพรที่มีส่วนประกอบ สรรพคุณ วิธีใช้ และข้อห้ามหรือข้อควรระวังชัดเจนตามตำรายาที่รัฐมนตรีประกาศ และมีการผลิตและใช้ในโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่องไม่น้อยกว่า 10 ปี หรือมีข้อมูลการใช้ในผู้ป่วยอย่างน้อย 1,000 ราย⁽¹⁾

โลหะหนักโดยทั่วไปจะพบเป็นองค์ประกอบของแร่ธาตุตามธรรมชาติ และไม่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการธรรมชาติ ความเจริญก้าวหน้าทางอุตสาหกรรมและเทคโนโลยี ทำให้มีการนำโลหะหนักมาใช้ในการกระบวนการผลิตมากขึ้น ทางเกษตรกรรมมีการใช้ปุ๋ยและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น ปัจจุบันมีขยะและน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนโลหะหนักจากโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน และขยะอิเล็กทรอนิกส์ที่พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 10 ต่อปี ซึ่งหากไม่มีวิธีการควบคุมมลพิษอย่างถูกวิธี และความแปรปรวนของภูมิอากาศของโลกทำให้เกิดฝนตกหนักและน้ำท่วม จะทำให้การแพร่กระจายของโลหะที่เป็นพิษไปสู่สิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น⁽²⁾ พิษจากโลหะหนักที่มีรายงานว่าพบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ พิษสารหนู พิษตะกั่ว พิษแคดเมียม พิษปรอท พิษโครเมียม และพิษแมงกานีส เป็นต้น โลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง เช่น สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะสะสมในร่างกายทำให้เกิดพิษได้ ทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง อาการพิษเฉียบพลันของสารหนูได้แก่ อาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง กล้ามเนื้อเกร็ง เกิดอาการแทรกซ้อนเกี่ยวกับการทำงานของหัวใจทำให้เสียชีวิตได้ และสารหนูยังเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ พิษของตะกั่วทำให้ทรงตัวไม่อยู่ เกิดอาการประสาทหลอน ชิม ไม่รู้สึกตัว ชัก มือและเท้าตก เป็นอัมพาต สลบ และอาจตายได้ พิษของแคดเมียมทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ปวดกระดูกสันหลัง แขน ขา ทำให้ไตทำงานผิดปกติอาจจะทำให้ไตพิการได้ ถ้าแคดเมียมสะสมเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงจะทำให้เกิดมะเร็ง⁽³⁾

เชื้อจุลินทรีย์ที่อาจพบปนเปื้อนในยาที่ผลิตจากสมุนไพร ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิดฝีหนอง จากการอักเสบของบาดแผล เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยในสัตว์ โอกาสปนเปื้อนในพืชสมุนไพรมาจากมูลของนกและหนูระหว่างการฝังด้วยยาให้แห้ง แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงพร้อมกับมีอาการอาเจียนร่วมด้วย เชื้อ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียตามธรรมชาติที่อาศัยในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ส่วนเชื้อ *Enterobacteria* จะพบตามธรรมชาติในพืช ยีสต์ (Yeasts) ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ แต่รา (Moulds) บางชนิดที่ผลิต mycotoxin จะทำให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ได้ เชื้อ *Clostridium* spp. เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้⁽⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2550 ลัดดา พูลสวัสดิ์ และคณะ ตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาแผนโบราณจำนวน 660 ตัวอย่าง พบผิดมาตรฐานร้อยละ 22.1 สาเหตุหลักคือการปนเปื้อนจากเชื้อ *Clostridium perfringens* สปอร์ของเชื้อ *Clostridium perfringens* ถ้าเจริญเติบโตได้จะสร้างพิษที่ทำให้เกิดอันตราย โดยจะทำให้เกิดการท้องร่วงและอาเจียน ปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค คือมากกว่า 10 ล้าน CFU ต่อกรัมของด้วยยา⁽⁵⁾

การควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพรในประเทศไทย ใช้เกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009)⁽⁶⁾ และประกาศตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 เรื่องหลักเกณฑ์การพิจารณาการขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ฉบับลงวันที่

25 มีนาคม 2547⁽⁷⁾ ซึ่งตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยและประกาศดังกล่าวกำหนดปริมาณโลหะหนักที่ยอมให้ตกค้างในผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรได้แก่ สารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน ตะกั่วไม่เกิน 10 ส่วนในล้านส่วน และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน ส่วนการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใช้มาตรฐานของประกาศตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาการขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนดให้ตรวจเชื้อ 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. และ *Clostridium* spp. ผู้ประกอบการที่จะขอขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ จะต้องมีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็นหลักฐานแสดงความปลอดภัยของยา

ปี พ.ศ. 2550-2552 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตรวจวิเคราะห์ยาแผนโบราณ นำส่งจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นยาที่มีเลขทะเบียนตำรับยาที่จำหน่ายในท้องตลาด และนำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 169 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนโลหะหนักสูงกว่ามาตรฐานร้อยละ 18.3⁽⁸⁾ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ได้ตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาแผนโบราณที่ขอขึ้นทะเบียนตำรับยาจำนวน 281 ตัวอย่าง พบผิดมาตรฐาน 64 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.8) ตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาแผนโบราณนำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 34 ตัวอย่าง พบผิดมาตรฐานจากเชื้อ *Clostridium* spp. 1 ตัวอย่าง ตรวจการปนเปื้อนสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาแผนโบราณที่จำหน่ายในท้องตลาดและยาจากสมุนไพรกลุ่มยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณในบัญชียาหลักแห่งชาติที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐจำนวน 52 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนสารหนูสูงกว่ามาตรฐานในยาจันทน์ลีลา 1 ตัวอย่าง และยาแผนโบราณ 1 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนแคดเมียมสูงกว่ามาตรฐานในยาแก้ไอหำราก 1 ตัวอย่าง และยาแผนโบราณ 1 ตัวอย่าง⁽⁹⁾

เนื่องจากยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติเป็นยาที่กระทรวงสาธารณสุขส่งเสริมให้มีการใช้เพิ่มขึ้นในโรงพยาบาลของภาครัฐ และปี พ.ศ. 2554 เกิดเหตุการณ์น้ำท่วมใหญ่ในประเทศไทย ที่อาจทำให้การแพร่กระจายของโลหะที่เป็นพิษไปสู่สิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น การศึกษานี้เป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพรกลุ่มยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ ภายใต้โครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา โดยสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2556 เพื่อประเมินความปลอดภัยด้านการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ยาที่ศึกษาครอบคลุมการใช้ยาตามกลุ่มอาการของโรค 7 กลุ่ม คือ ยาแก้ไอ ยารักษาอาการทางระบบไหลเวียนโลหิต ยารักษาอาการระบบทางเดินหายใจ ยารักษาอาการทางระบบทางเดินอาหาร ยาบรรเทาอาการท้องเสีย ยารักษาอาการทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา และยารักษาอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูก ได้แก่ ตำรับยาเขียวหอม ยาจันทน์ลีลา ยาแก้ไอหำราก ยาหอมเทพจิตร ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ ยาประสะมะแว้ง ยาธาตุบรรจบ ยาเหลืองปิดสมุทร ยาประสะไพล และยาสหัสธารา

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาจากสมุนไพรกลุ่มยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณในบัญชียาหลักแห่งชาติที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐเป็นยาที่ผลิตโดยโรงพยาบาลภาครัฐจำนวน 17 แห่ง จำแนกเป็นโรงพยาบาลที่ผลิตยาจากสมุนไพรในภาคเหนือ 4 แห่ง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 แห่ง ภาคตะวันออก 2 แห่ง ภาคใต้ 6 แห่ง และภาคกลาง 2 แห่ง และยาที่ผลิตโดยภาคเอกชน 13 แห่ง รวมจำนวนทั้งสิ้น 30 แห่ง จำนวน 11 ตำรับ 156 ตัวอย่าง

1. การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ในยาจากสมุนไพร โดยใช้วิธี Atomic Absorption Spectrophotometry, Graphite furnace⁽¹⁰⁾

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer บริษัท PerkinElmer รุ่น Analyst 800
- เครื่องชั่ง (Analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler รุ่น AT200
- ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุสารละลายตัวอย่างในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก ชนิด high density ให้ล้างด้วยกรดไนตริกโดยแช่ในกรดไนตริก 10% นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง แล้วคว่ำให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน
- กระดาษกรอง Whatman No.1

สารเคมีและสารมาตรฐาน

- Nitric acid (AR grade) บริษัท CARLOERBA
- Palladium (Pd) 10,000 mg/L, AA grade บริษัท PerkinElmer
- Magnesium nitrate solution 10,000 mg/L, AA grade บริษัท PerkinElmer
- Mixed standard solution (As, Pb, Cd) (AA grade) บริษัท PerkinElmer
- น้ำกลั่นหรือน้ำ Type I, resistivity ≥ 16.0 Mohm จากเครื่อง Elix 20 บริษัท Millipore

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงสมุนไพรแห้งน้ำหนักแน่นอน 0.25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ (beaker) ทรงสูงขนาด 100 มิลลิลิตร เติมนitric acid: H₂O (1:1) 5 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนอ่างอังไอน้ำนาน 30 นาที ยกลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมนitric acid 5 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนอ่างอังไอน้ำต่ออีก 90 นาที หรือจนผงสมุนไพรถูกย่อยสลายหมด ถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำ Type I ถ้าสารละลายขุ่นนำไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1

การเตรียมสารละลายแบลนด์

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายตัวอย่างแต่ไม่ต้องมีส่วนผสมของสารตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของสารหนู (As) และตะกั่ว (Pb) 50 ส่วนในพันล้านส่วน และแคดเมียม (Cd) 2.5 ส่วนในพันล้านส่วน

วิธีการตรวจวิเคราะห์

สร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโลหะ โดยกำหนดความเข้มข้นของสารหนูและตะกั่วเท่ากับ 10, 20, 30, 40 และ 50 ส่วนในพันล้านส่วน ความเข้มข้นของแคดเมียมเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ส่วนในพันล้านส่วน โดยตั้งระบบการทำงานของเครื่องให้เจือจางสารละลายมาตรฐานอัตโนมัติ และกำหนดความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอย่างน้อยเท่ากับ 0.995 แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมในสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน สภาวะการทำให้เกิดอะตอมดังตาราง

	Elements	As	Pb	Cd
Wavelength (nm)	193.7	283.3	228.8	
Pyrolysis temp (°C)	1200	500	500	
Atomize temp (°C)	2100	1500	1500	
Matrix modifiers	0.005 mg	0.003 mg	0.003 mg	
	Palladium	Magnesium nitrate	Magnesium nitrate	

การประเมินผล

ใช้เกณฑ์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009) และประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ระบุปริมาณโลหะหนักที่ยอมให้ตกค้างในผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรได้แก่ สารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน ตะกั่วไม่เกิน 10 ส่วนในล้านส่วน และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน

2. การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพร⁽¹¹⁾

วัสดุและอุปกรณ์

สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Buffer Sodium Chloride–Peptone Solution pH 7.0, Tryptic Soy Agar, Sabouraud Dextrose Agar with Antibiotics, Fluid Lactose Medium, Fluid Enterobacteria Enrichment Medium, Crystal Violet–Neutral Red–Bile–Dextrose Agar, Fluid Casein Digest–Soy Lecithin Polysorbate 20 Medium, Mannitol Salt Agar, Baird–Parker Agar, MacConkey Broth, MacConkey Agar, Levine Eosin–Methylene Blue Agar, Fluid Tetrathionate Medium, Rappaport Vassiliadis Broth, Brilliant Green Agar, Xylose–Lysine–Deoxycholate Agar, Bismuth Sulfite Agar, Columbia Agar, Reinforced Medium for Clostridia, Triple Sugar–Iron–Agar, Sheep Blood Agar, Egg–Yolk Agar

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

Escherichia coli ATCC 8739

Salmonella Abony NCTC 6017

Clostridium sporogenes ATCC 19404

เครื่องมือและอุปกรณ์

Fan Filter, Laminar Flow Cabinet, Water bath 42–44 °C และ 80 °C, Incubator 30–35 °C, 20–25 °C และ 35–37 °C, เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 กรัม, Pipettes, Micropipettes, Macropipettes, Petri dish, Glass bottles, Loops, Needles, เครื่องแยกชนิดเชื้อจุลินทรีย์อัตโนมัติของบริษัท bioMerieux รุ่น VITEK 32 และ VITEK cards

วิธีการหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

ตรวจปริมาณ **Total viable aerobic count** ใช้วิธี Pour plate โดยนำตัวอย่าง 10 กรัม เจือจางให้เป็น 10^{-1} ถึง 10^{-5} ด้วย Buffer Sodium Chloride–Peptone Solution pH 7.0

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเชื้อใน Tryptic Soy Agar 2 plates ต่อหนึ่งความเข้มข้น บ่มที่ 30–35 °C เป็นเวลา 5 วันหรือน้อยกว่า เมื่อสามารถนับเชื้อได้ ให้นำจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่าง 1 กรัม

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเชื้อใน Sabouraud Dextrose Agar with Antibiotics จำนวน 2 plates ต่อหนึ่งความเข้มข้น บ่มที่ 20–25 °C เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อราในตัวอย่าง 1 กรัม

ตรวจปริมาณ Enterobacteria ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม เติม Fluid Lactose Medium ให้ครบ 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 2–5 ชั่วโมง เจือจางตัวอย่างต่อ ให้เป็น 10^{-2} ถึง 10^{-4} ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วนำไปเพาะเชื้อใน Fluid Enterobacteria Enrichment Medium ความเข้มข้นละ 1 หลอด บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเชื้อบน Crystal Violet–Neutral Red–Bile–Dextrose Agar บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง แปลผลปริมาณ Enterobacteria ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยอ่านค่าจากตาราง Probable Number of Bacteria

Escherichia coli ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม เจือจางโดยการเติม Buffer Sodium Chloride–Peptone Solution pH 7.0 ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Fluid Casein Digest–Soy Lecithin Polysorbate 20 Medium 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 18–48 ชั่วโมง ปิเปตตัวอย่างที่บ่มแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ใน MacConkey Broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 43–45 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเพาะเชื้อบน MacConkey Agar บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 18–72 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อขึ้นให้น้ำเชื้อที่สงสัยเพาะบน Levine Eosin–Methylene Blue Agar บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง

Salmonella spp. ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ใน Fluid Casein Digest–Soy Lecithin Polysorbate 20 Medium 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง แล้วแยกเพาะเชื้อต่อในหลอดทดสอบ 2 หลอด ที่บรรจุ Fluid Tetrathionate Medium และ Rappaport Vassiliadis Broth หลอดละ 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 35–37 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเพาะเชื้อบน Brilliant Green Agar, Xylose–Lysine–Deoxycholate Agar และ Bismuth Sulfite Agar บ่มที่ 35–37 °C, 18–72 ชั่วโมง

Clostridium spp. ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม เจือจางด้วย Buffer Sodium Chloride–Peptone Solution pH 7.0 ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Reinforced Medium for Clostridia จำนวน 2 หลอด หลอดแรกนำไป heat shock ที่ 80 °C, 10 นาที และทำให้เย็นทันที หลอดที่ 2 ไม่ต้องให้ความร้อน บ่มที่ 35–37 °C ในสภาวะไร้อากาศ 1–4 วัน เพาะเชื้อบน Columbia Agar ที่ใส่ gentamicin บ่มที่ 35–37 °C ในสภาวะไร้อากาศ 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่สงสัยเพาะบน Columbia Agar จำนวน 2 plates plate แรก บ่มที่ 35–37 °C ในสภาวะไร้อากาศ 48 ชั่วโมง plate ที่สอง บ่มที่อุณหภูมิ 35–37 °C ในสภาวะมีอากาศ 48 ชั่วโมง

การยืนยันผล

การตรวจหา *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. ยืนยันผลด้วยวิธีชีวเคมี (Biochemistry) และด้วยเครื่องแยกชนิดเชื้อจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEK 32

การประเมินผลตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009) ดังตาราง

Total aerobic microbial count	$\leq 2 \times 10^5/\text{g}$
Yeasts & Moulds count	$\leq 2 \times 10^4/\text{g}$
Bile-tolerant gram-negative bacteria	$\leq 10^3/\text{g}$
<i>Escherichia coli</i>	Absence/g
<i>Salmonella</i> spp.	Absence/10 g
<i>Clostridium</i> spp.	Absence/g

ผล

การปนเปื้อนสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมในยาจากสมุนไพรจำนวน 156 ตัวอย่างตรวจพบการปนเปื้อนสูงกว่ามาตรฐาน 4 ตำรับ 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.8) โดยพบปนเปื้อนสารหนูสูงกว่ามาตรฐานในตำรับยาเขียวหอม 1 ตัวอย่าง พบปนเปื้อนตะกั่วสูงกว่ามาตรฐานในตำรับยาหอมนวโกฐ 2 ตัวอย่าง พบปนเปื้อนแคดเมียมสูงกว่ามาตรฐานในตำรับยาแก้ไอห้าราก 2 ตัวอย่าง และยาประสะมะแว้ง 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การปนเปื้อนสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมในยาจากสมุนไพร 156 ตัวอย่าง

ชื่อยา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่างที่	ชนิดของ โลหะที่	ปริมาณที่ตรวจพบ เกณฑ์มาตรฐาน* ส่วนในล้านส่วน (ppm)		
ยาเขียวหอม	5	1	สารหนู	ไม่พบ-115.0	0.1-3.9	0.07-0.20
ยาจันทน์ลีลา	32	-	-	ไม่พบ-0.4	0.0-3.3	0.03-0.19
ยาแก้ไอห้าราก	18	2	แคดเมียม	ไม่พบ-0.2	0.1-5.4	0.02-0.50
ยาหอมนวโกฐ	20	2	ตะกั่ว	ไม่พบ-0.3	0.3-13.9	0.05-0.25
ยาหอมเทพจิตร	5	-	-	ไม่พบ-0.2	0.3-1.9	0.01-0.20
ยาหอมบำรุงหัวใจ	2	-	-	ไม่พบ	0.1-0.4	0.10-0.19
ยาประสะมะแว้ง	20	1	แคดเมียม	ไม่พบ-0.3	0.2-1.3	0.01-0.51
ยาธาตุบรรจบ	11	-	-	ไม่พบ-3.3	0-8.5	0.01-0.11
ยาเหลืองปิดสมุทร	7	-	-	ไม่พบ-0.5	0.1-1.9	0.03-0.25
ยาประสะไพล	24	-	-	ไม่พบ-0.9	0.2-2.1	0.03-0.24
ยาสหัสธารา	12	-	-	ไม่พบ-0.2	0.3-5.9	0.01-0.06
รวม		156	6			

*เกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009)

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพรจำนวน 116 ตัวอย่างตรวจพบไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 7 ตำรับ 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.9) ได้แก่ ตำรับยาจันทน์ลีลา ยาแก้ไข้ห้าราก ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ ยาธาตุนครบยาประสะไพล และยาสหัสธารา บางตำรับตรวจพบการปนเปื้อนทั้ง Total aerobic microbial count, Bile-tolerant gram-negative bacteria และ *Clostridium* spp. ได้แก่ ยาจันทน์ลีลา ยาหอมนวโกฐ และยาประสะไพล (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพร 116 ตัวอย่าง

ชื่อยา	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์	จำนวนตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน* จำแนกตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์					
			Total Aerobic Microbial count	Total combined Yeasts & Moulds count	Bile-tolerant Gram Negative Bacteria	<i>Eschericia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.
ยาเขียวหอม	2	-	-	-	-	-	-	-
ยาจันทน์ลีลา	20	7	6	-	3	-	-	6
ยาแก้ไข้ห้าราก	12	2	2	-	-	-	-	-
ยาหอมนวโกฐ	18	6	6	-	1	-	-	2
ยาหอมเทพจิตร	2	-	-	-	-	-	-	-
ยาหอมบำรุงหัวใจ	2	2	1	-	-	-	-	1
ยาประสะมะแว้ง	14	-	-	-	-	-	-	-
ยาธาตุนครบ	10	4	4	-	-	-	-	-
ยาเหลืองปิดสมุทร	5	-	-	-	-	-	-	-
ยาประสะไพล	19	6	6	-	1	-	-	4
ยาสหัสธารา	12	3	2	-	1	-	-	-
รวม	116	30	27	-	6	-	-	13

*เกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009)

สรุปผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนักในยาจากสมุนไพร ตรวจพบการปนเปื้อนสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานทั้งสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ Total Aerobic Microbial count, *Clostridium* spp. และ Bile-tolerant Gram-Negative Bacteria ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน คิดเป็นร้อยละ 23.3, 11.2 และ 5.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 สรุปผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพร

รายการที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน	ร้อยละ
การปนเปื้อนโลหะหนัก (ตรวจวิเคราะห์จำนวน 156 ตัวอย่าง)	3.8
- การปนเปื้อนสารหนู	0.6
- การปนเปื้อนตะกั่ว	1.3
- การปนเปื้อนแคดเมียม	1.9
การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (ตรวจวิเคราะห์จำนวน 116 ตัวอย่าง)	25.9
- การปนเปื้อน Total Aerobic Microbial count	23.3
- การปนเปื้อน Bile-tolerant Gram-Negative Bacteria	5.2
- การปนเปื้อน <i>Clostridium</i> spp.	11.2

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนักในยาจากสมุนไพร พบการปนเปื้อนสารหนูสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานถึง 28.8 เท่า ในยาเขียวหอมที่ผลิตโดยภาคเอกชน 1 ตัวอย่าง พบปนเปื้อนตะกั่วสูงกว่ามาตรฐานในยาธาตุบรรจบและยาหอมนวโกฐ พบปนเปื้อนแคดเมียมสูงกว่ามาตรฐานในยาแก้ไข้หำรากและยาประสะมะแว้ง ยาจากสมุนไพรที่พบการปนเปื้อนตะกั่วและแคดเมียมสูงกว่ามาตรฐานเป็นยาที่ผลิตจากโรงพยาบาลในภาคใต้ 3 แห่ง สาเหตุการปนเปื้อนอาจเกิดจากการใช้วัตถุดิบสมุนไพรที่ได้จากแหล่งปลูกบริเวณที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม หรืออาจเกิดจากการทำความสะอาดวัตถุดิบไม่เหมาะสม ส่วนของพืชที่เป็นราก ลำต้นใต้ดิน และส่วนของพืชที่สัมผัสดินได้ง่าย จะมีโอกาสปนเปื้อนโลหะหนักจากดินได้ง่ายกว่าส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน ในตำรับยาแก้ไข้หำรากมีส่วนประกอบเป็นรากพืช 5 ชนิดได้แก่ รากย่านาง รากคนทา รากมะเดื่อชุมพร รากชิงชี รากไม้เท้ายายม่อม ยาประสะมะแว้งมีส่วนประกอบของเหง้าขมิ้นอ้อย ยาธาตุบรรจบมีส่วนประกอบของเหง้าขิงและหัวเปราะหอม⁽¹²⁾ ตำรับยาที่ตรวจพบการปนเปื้อนตะกั่วสูงกว่ามาตรฐานและพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง Total aerobic microbial count, Bile-tolerant gram-negative bacteria และ *Clostridium* spp. คือ ยาหอมนวโกฐ ซึ่งในตำรับมีส่วนประกอบเป็นพืชสมุนไพร 54 ชนิด และพืชมูล เป็นพืชสมุนไพรที่มาจากส่วนที่เป็นรากและลำต้นใต้ดิน เช่น รากผักหอม รากชะเอมเทศ เหง้าขิงแห้ง หัวหัวหมู สมุนไพรส่วนที่สัมผัสกับดินได้ง่าย เช่น เถาบอระเพ็ดและสมุนไพรที่มีขนาดเล็ก และทำความสะอาดยาก เช่น เทียนทั้งแก้ว สาเหตุการปนเปื้อนดังกล่าวอาจเกิดจากการใช้วัตถุดิบสมุนไพรจากแหล่งปลูกที่มีการปนเปื้อนตะกั่วและการทำความสะอาดสมุนไพรไม่เหมาะสม ส่วนตำรับที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ยาหอมเทพจิตรและยาเหลืองปิดสมุทร

ยาเขียวหอมในบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติในตำรับมีส่วนประกอบเป็นพืชสมุนไพรทั้งสิ้น ไม่มีส่วนประกอบที่เป็นแร่ธาตุแต่อย่างใด ระบุขนาดที่ใช้ในผู้ใหญ่เท่ากับ 1 กรัม ทุก 4-6 ชั่วโมง และไม่ควรรใช้ติดต่อกันเกิน 3 วัน ค่า Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) ของสารหนูที่ The Joint FAO/WHO Expert Committee ON Food (JECFA) กำหนดไว้เท่ากับ 0.015 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หรือเท่ากับ 0.002 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน⁽¹³⁾ ซึ่งเมื่อคิดเป็นปริมาณสารหนูต่อน้ำหนักตัว 60 กิโลกรัม จะได้เท่ากับ 0.129 มิลลิกรัมต่อวัน ตัวอย่างยาเขียวหอมที่พบปนเปื้อนสารหนูสูงถึง 115 ส่วนในล้านส่วน หรือ 0.115 มิลลิกรัมต่อกรัม รายละเอียดของตัวอย่างไม่ได้ระบุเลขทะเบียนตำรับยาและส่วนประกอบ เมื่อคำนวณปริมาณการได้รับสารหนูของการใช้ครั้งละ 1 กรัม ทุก 4 ชั่วโมง จะได้เท่ากับ 0.69 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งสูงกว่าค่าที่ JECFA กำหนดไว้ประมาณ 5 เท่า อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการหาปริมาณสารหนูรวม ยังไม่ได้ศึกษาสถานะออกซิเดชัน และสารประกอบของสารหนูที่อยู่ในสถานะออกซิเดชัน +3 มีความเป็นพิษมากกว่าสารประกอบของสารหนูในสถานะออกซิเดชัน +5 จึงควรหาสาเหตุการปนเปื้อนและศึกษาสถานะออกซิเดชันของสารประกอบของสารหนู เพื่อดำเนินการแก้ไขต่อไป

ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างยาจากสมุนไพรจำนวนเพียง 116 ตัวอย่าง เนื่องจากอีก 40 ตัวอย่าง มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ผลการวิเคราะห์พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในยา 7 ตำรับ 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.9 จากโรงพยาบาลผู้ผลิตยาจากสมุนไพรในทุกภาค ส่วนยาที่ผลิตจากภาคเอกชนตรวจไม่พบการปนเปื้อน โดยพบการปนเปื้อน Total aerobic microbial count สูงสุด 27 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *Clostridium* spp. 13 ตัวอย่าง และ Bile-tolerant gram-negative bacteria 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนทั้ง Total aerobic microbial count, Bile-tolerant gram-negative bacteria และ *Clostridium* spp. ได้แก่ ตำรับยาจันทน์ลีลา ยาแก้ไข้หำราก ยาหอมนวโกฐ และยาประสะโพลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว อาจเกิดจากยาทั้ง 4 ตำรับ มีส่วนประกอบที่เป็นพืชสมุนไพรจากส่วนที่เป็นรากลำต้นใต้ดิน ส่วนของพืชที่สัมผัสกับดินได้ง่าย และสมุนไพรที่มีขนาดเล็กและทำความสะอาดยาก ในยาจันทน์ลีลามีส่วนประกอบของรากปลาไหลเผือก ยาแก้ไข้หำราก มีส่วนประกอบของรากพืช

5 ชนิด ยาหอมนวโกฐมีส่วนประกอบของรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพลู เหง้าชิง หัวแห้วหมู เกือบอะระเพ็ด และสมุนไพรมีขนาดเล็ก เช่น เทียนทั้งเก้า ยาประสะโพลมีส่วนประกอบของเหง้าโพล เหง้าชิง เหง้าขมิ้นอ้อย เหง้าว่านน้ำ และตัวอย่างยาจากสมุนไพรรวม 116 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนจากอุจจาระของมนุษย์หรือมูลสัตว์การศึกษาครั้งนี้ตรวจการปนเปื้อน *Clostridium* spp. เท่านั้น ไม่ได้ตรวจพิสูจน์ว่าเป็น *Clostridium perfringens* หรือ *Clostridium botulinum* เนื่องจากเกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรรักษาโรคระบุว่ายาจากสมุนไพรรักษาโรคต้องไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *Clostridium* spp. เนื่องจากเชื้อ *Clostridium* spp. เพียง 1 เซลล์ ถ้าสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ก็สามารถสร้างพิษ (toxin) และทำให้เกิดอันตรายได้

จากการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใช้อากาศ (Total aerobic microbial count) และ *Clostridium* spp. ในยาจากสมุนไพรรักษาโรคข้างสูงนั้น สาเหตุการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ขั้นตอนการปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาวัตถุดิบ ความสะอาดของสถานที่ สุลักษณะของบุคลากรที่มีส่วนในการผลิต และวิธีการทำความสะอาดสมุนไพรมะสมกับสมุนไพรมะแต่ละชนิด สมุนไพรมะบางชนิดที่ไม่สามารถทำความสะอาดโดยการล้างน้ำ เช่น ดอกผลที่มีขนาดเล็กมาก หรือการล้างน้ำอาจทำให้สูญเสียสารสำคัญ การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์อาจใช้รังสีแกมมาขนาดไม่เกิน 10 กิโลเกรย์ แทน การเก็บสมุนไพรมะต้องบรรจุในภาชนะที่สะอาดและปิดสนิท นอกจากนี้สภาพภูมิอากาศ เช่น ความร้อนและความชื้น เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในปริมาณสารสำคัญและเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ได้เช่นกัน⁽¹⁴⁾

เนื่องจากวัตถุดิบสมุนไพรมะจากแหล่งปลูกที่สภาพภูมิประเทศและสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน จะมีสารสำคัญไม่เท่ากัน มีปัญหาจากการปนเปื้อนฝุ่นละออง โลหะหนัก ยาฆ่าแมลง สารพิษอื่นๆ และการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ การควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพรมะจึงควรดำเนินการตั้งแต่ต้นทางคือวัตถุดิบสมุนไพรมะ ต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติเฉพาะของตัวยาสุมุนไพรมะ ร่วมกับการตรวจสอบสารเจือปน สารปลอมปน ตรวจการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ข้อมูลการศึกษาความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรมะในบัญชียาหลักแห่งชาติในครั้งนี้ จะนำไปสื่อสารความเสี่ยงและเตือนภัยสุขภาพเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับยาที่มีคุณภาพและปลอดภัย และใช้ประกอบการประชุมหารือร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชน เพื่อปรับปรุงวิธีการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและการผลิตยาจากสมุนไพรมะตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพรมะขององค์การอนามัยโลก⁽¹⁵⁾ เป็นการประกันคุณภาพยาจากสมุนไพรมะพร้อมกับการกระตุ้นให้เกิดการวิจัยและพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพในระดับที่ยอมรับของสากลซึ่งเป็นประโยชน์ในการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตยาจากสมุนไพรมะภายในประเทศ สนับสนุนการพึ่งพาตนเองของประชาชนและช่วยแก้ปัญหาด้านเศรษฐกิจของประเทศอีกทางหนึ่ง

สรุป

การศึกษาความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรมะกลุ่มยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณในบัญชียาหลักแห่งชาติที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐ พบการปนเปื้อนโลหะหนักสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 3.8 ในยา 4 ตำรับ ได้แก่ ยาเขียวหอม ยาหอมนวโกฐ ยาแก้ไข้ห่าราก และยาประสะมะแว้ง ตัวอย่างยาเขียวหอมที่ตรวจพบการปนเปื้อนสารหนูสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานเป็นยาที่ผลิตโดยภาคเอกชน ควรศึกษาสถานะออกซิเดชันของสารหนูที่ตรวจพบ และหาสาเหตุการปนเปื้อนเพื่อดำเนินการแก้ไขต่อไป ส่วนตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนตะกั่ว และแคดเมียมสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน เป็นยาที่ผลิตจากโรงพยาบาล 3 แห่ง ในภาคใต้ สาเหตุอาจเกิดจากการใช้วัตถุดิบจากแหล่งปลูกที่มีการปนเปื้อนโลหะดังกล่าวในสิ่งแวดล้อมและการทำความสะอาดวัตถุดิบไม่เหมาะสม การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตรวจพบไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 25.9 ในยา 7 ตำรับ ได้แก่ ยาจันทร์ลีลา ยาแก้ไข้ห่าราก ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ ยาธาตุบรรจบ ยาประสะโพล และยาสหัสธารา และยาทุกตำรับตรวจไม่พบเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ Yeasts &

Moulds ตำรับที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก ได้แก่ ยาหอมเทพจิตรและยาเหลือบิดสมุทร จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง เป็นยาที่ผลิตจากโรงพยาบาลที่ผลิตยาจากสมุนไพรในทุกภาคของประเทศ ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ตั้งแต่วัตถุดิบที่ใช้และขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิต ผู้ผลิตยาควรนำหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพรมาปรับปรุงวิธีการผลิตยาจากสมุนไพรเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ยาที่มีคุณภาพและปลอดภัย

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2549 ตามประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2549 เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2547 (ฉบับที่ 4). กรุงเทพฯ : ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2549.
2. อวรรณ พุพิสุทธิ, ศุภพร แสงกระจ่าง. ความเป็นพิษของขมิ้นชันและขมิ้นชัน. วารสารพิษวิทยาไทย 2553; 25(1): 67-76.
3. ทรงพล โตขันธ์. โลหะหนักที่มีพิษต่อสุขภาพ. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ [วารสารออนไลน์]. พฤศจิกายน 2555; [สืบค้น 5 มีนาคม 2557]; [8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://eic.wu.ac.th/Data_Download/Research/Metals%20toxic.pdf
4. นันทนา สิทธิชัย. มาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย. วารสารสมุนไพรไทย 2547; 11(1): 21-32.
5. ลัดดา พูลสวัสดิ์, สันติพงษ์ วงศ์เพ็ญทักษ์, สมมาตร กลมกลิ้ง. การสำรวจปริมาณเชื้อ Clostridium perfringens ในยาแผนโบราณ. ใน : การประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 15 เรื่องวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อความมั่นคงสุขภาพ. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550. หน้า 133.
6. Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia Vol. III. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2009.
7. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 121 ตอนพิเศษ 43 ง (ลงวันที่ 21 เมษายน 2547).
8. วิมล สุวรรณเกษาวงศ์. คุณภาพและความปลอดภัยของยาแผนโบราณ : ปัญหาการใช้ยาแผนโบราณ. วารสารพิษวิทยาไทย 2552; 24(2): 18-9.
9. สำนักยาและวัตถุเสพติด. รายงานประจำปี 2554. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2554.
10. Bureau of Drug and Narcotic. Department of Medical Sciences. Determination of Heavy Metal Contamination in Traditional medicine. SOP No. 2202168. revision 0; July 2013: 1-8.
11. Department of Medical Sciences. Thai Pharmacopoeia, Supplement 2010. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2010.
12. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. คู่มือการใช้ยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2555. กรุงเทพฯ : ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2555.
13. ชนิพรรณ บุตรยี่, พชณี อินทรลักษณ์. รูปแบบการประเมินความเสี่ยงสำหรับการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร. วารสารพิษวิทยาไทย 2552; 24(1): 47-60.
14. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร. แนวทางการผลิตวัตถุดิบสมุนไพร. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2538.
15. World Health Organization. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. Geneva, Switzerland: WHO; 2007.

Safety of herbal medicines in the National List of Essential Medicines

**Chitra Chaiyawat Jiranuch Jamtaweekul Santipong Wongpentak
and Prachyaporn Inthongkaew**

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences. Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand

ABSTRACT Herbal medicines in the National List of Essential Medicines are medicines which the Ministry of Public Health encourages their use in government hospitals as an alternative to relieve symptoms or treat diseases, as well as, to replace imported medicines. During fiscal year B.E. 2012–2013, Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences carried out a project on quality assurance of herbal medicines used in government hospitals by conducting safety studies consisting of tests for heavy metals and microbial contamination in herbal recipes, specified in the National List of Essential Medicines. Those recipes were herbal medicines in the following categories: antipyretic drugs, drugs used in symptomatic treatment of circulatory symptoms, respiratory system disorders, gastro-intestinal tract disorders, anti-diarrheal drugs, obstetrics and gynecological disorders and drugs used in musculo-skeletal symptoms. The recipes selected according to the mentioned categories were Ya-Khiewhom, Ya-Chanleela, Ya-Kaekaiharak, Yahom-Navakhoth, Yahom-Thepachit, Yahom-Bumronghuachai, Ya-Prasamawang, Ya-Thadbunchob, Ya-Leongpidsamut, Ya-Prasaplai and Ya-Sahastara. The tests for heavy metals and microbial contamination were carried out using atomic absorption spectroscopy and Thai Herbal Pharmacopoeia's method, respectively. The results, evaluated according to the Thai Herbal Pharmacopoeial standard criteria, showed that 3.8% of 156 samples, 4 recipes, including Ya-Khiewhom, Ya-Kaekaiharak, Yahom-Navakhoth and Ya-Prasamawang had arsenic, lead and cadmium levels higher than the acceptable limits, whereas, 25.9% of 116 samples, 7 recipes, including Ya-Chanleela, Ya-Kaekaiharak, Yahom-Navakhoth, Yahom-Bumronghuachai, Ya-Thadbunchob, Ya-Prasaplai and Ya-Sahastara were found to be microbial contaminated. The recipes passed the acceptable limits on heavy metals and microbial contamination were Yahom-Thepachit and Ya-Leongpidsamut.

Key words: safety, herbal medicines, National List of Essential Medicines, heavy metals, micro-organisms

การประเมินความเสี่ยงด้านสิ่งแปลกปลอม ในเส้นก๋วยเตี๋ยว

ทงนพันธ์ สัจจาละ ชันทอง เพ็ชรนอก ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์ และกนกวรรณ ต้นสกุล
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ก๋วยเตี๋ยวเป็นอาหารที่นิยมบริโภค มีประวัติความเป็นมาอย่างยาวนาน และเป็นผลิตภัณฑ์ มูลค่าเพิ่มที่ส่งออกจำหน่ายต่างประเทศ โดยเฉพาะตลาดหลักอย่างสหรัฐอเมริกา ที่มีการกักกันก๋วยเตี๋ยวนำเข้าจากไทย เนื่องจากพบสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (light filth) เช่น ขนหนู ขนแมว ขนสุนัข ชิ้นส่วนแมลง เป็นต้น ล้วนเป็นสิ่งที่น่ารังเกียจของผู้บริโภค มากกว่าเกณฑ์ที่องค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (U.S.FDA.) กำหนด ขณะที่ประเทศไทยยังไม่มีข้อมูล เรื่องสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ในเส้นก๋วยเตี๋ยว ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงทำการประเมินความเสี่ยงด้าน light filth ในก๋วยเตี๋ยวเส้นสดและเส้นแห้ง อย่างละ 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 6 sub-samples ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 โดยใช้เกณฑ์ของ U.S.FDA. พบว่าก๋วยเตี๋ยวทั้ง 100 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของ light filth โดยก๋วยเตี๋ยวเส้นสด พบชิ้นส่วนแมลงไม่ผ่านเกณฑ์ (225 ชิ้น) 29 ตัวอย่าง (ร้อยละ 58) และเส้นแห้ง 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22) แสดงว่าเส้นสดมีความเสี่ยงที่จะตกเกณฑ์มากกว่าเส้นแห้ง 2.63 เท่า ส่วนจำนวนขนหนูที่ตรวจพบเฉลี่ย 0.1-1.3 เส้น อยู่ในเกณฑ์กำหนด (2.5 เส้น) การป้องกันไม่ให้ light filth ปนเปื้อนลงไปในผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญที่สุดโดยโรงงานต้องปรับปรุงสุขลักษณะการผลิต เริ่มจากการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบให้มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด รักษาความสะอาดบริเวณผลิต และปิดช่องเปิดสู่ภายนอกที่นก หนู แมลงจะเข้ามาสู่โรงงาน รวมทั้งการรักษาสุขอนามัยส่วนบุคคล ทั้งหมดนี้ต้องทำอย่างเป็นองค์รวมจึงจะได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประทานก๋วยเตี๋ยวที่สะอาด และผลิตภัณฑ์ยังสามารถส่งออกไปยังตลาดสำคัญคือสหรัฐอเมริกาโดยไม่ถูกกักกัน

บทนำ

ก๋วยเตี๋ยวเป็นอาหารประเภทเส้นของจีน สันนิษฐานกันว่าเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่สมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช ซึ่งเป็นช่วงที่ไทยมีการติดต่อกับชาวต่างชาติอย่างมาก และชาวจีนได้นำก๋วยเตี๋ยวเข้ามารับประทานกันในเรือ โดยต้มในน้ำซุ๊ป มีการใส่หมู ใส่ผัก และเครื่องปรุงเพื่อความอร่อย แต่สำหรับคนไทยแล้วถือว่าเป็นสิ่งที่แปลกใหม่ ในยุคนั้น ได้นำมาประกอบเป็นอาหารจนเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี และเริ่มมีการทำเส้นก๋วยเตี๋ยวในประเทศไทย ในสมัยจอมพล ป. พิบูลสงคราม เป็นนายกรัฐมนตรีได้มีนโยบายรัฐนิยมที่สนับสนุนให้ประชาชนบริโภคก๋วยเตี๋ยว ซึ่งเห็นว่าหากประชาชนหันมาร่วมกันบริโภคก๋วยเตี๋ยวจะเป็นการช่วยเหลือเศรษฐกิจของชาติในเวลานั้น เพื่อให้เงินหมุนเวียนในประเทศ⁽¹⁾

ก๋วยเตี๋ยวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากข้าวหักหรือปลายข้าวเจ้าซึ่งมีราคาถูก เมื่อผ่านการแปรรูปจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น ปัจจุบันยังคงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยทั่วไปทุกเพศทุกวัยทั้งเด็ก สตรี และคนชรา มีขายตามแผงลอย ร้านอาหาร ภัตตาคาร ศูนย์อาหารในห้างสรรพสินค้า จนกระทั่งในโรงแรมหรู ประเทศไทยผลิตก๋วยเตี๋ยวเพื่อบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก ซึ่งการกำกับดูแลการผลิตก๋วยเตี๋ยวจะอยู่ภายใต้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 193) พ.ศ. 2543 (ฉบับที่ 2) กำหนดประเภทอาหารเพิ่มเติมในลำดับที่ 61 ให้การผลิตก๋วยเตี๋ยวที่ทำจากแป้งข้าวเจ้าต้องเป็นไปตามหลักสุขลักษณะการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices: GMP) ส่วนสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นตลาดหลักแห่งหนึ่งของอาหารส่งออก มีกฎหมายอาหาร ยา และเครื่องสำอาง มาตรา 402 (a)(3) และ (4)⁽²⁾ กำหนดว่าอาหารที่ตรวจพบสิ่งสกปรก (filthy) สำนักงานอาหารและยา (Food and Drug Administration; US.FDA.) จะพิจารณาตามเกณฑ์ Defect Action Levels (DAL) ถ้าตกเกณฑ์ให้จัดเป็นอาหารที่มีกระบวนการผลิตและหรือบรรจุอย่างไม่ถูกต้องตามหลักสุขลักษณะ ถือว่าละเมิดต่อกฎหมาย ซึ่งจะทำให้เกิดสภาพบังคับตามมาคือ การยึด (seizure) การเรียกคืน (recall) การดำเนินคดีต่อผู้ผลิต (prosecution) กรณีอาหารนำเข้าจะถูกกักกันที่ด่าน (detention) ซึ่งการกักกันสินค้าก๋วยเตี๋ยวจากไทย มีสาเหตุสำคัญคือ light filth⁽³⁾ ส่วนประเทศไทยโดยกระทรวงสาธารณสุข ได้มีมติให้ร้านอาหารใช้ก๋วยเตี๋ยวที่สะอาดปลอดภัยไร้สารพิษ ซึ่งกำหนดให้ใช้ก๋วยเตี๋ยวที่ไม่มีสารกันบูดเกินมาตรฐานแต่ยังไม่มีข้อมูลเรื่องสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กที่นำรังเกียจ มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น เช่น ชิ้นส่วนแมลง (ปีก ลำตัว ขา หนวด ฯลฯ) ขนหนู ขนคน ขนนก เป็นต้น⁽⁴⁾ สิ่งแปลกปลอมเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะ คือความสะอาดในการผลิตโดยตรง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักในด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคจึงทำการประเมินความเสี่ยงด้านสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ในก๋วยเตี๋ยวสดและก๋วยเตี๋ยวแห้ง

วัสดุและวิธีการ

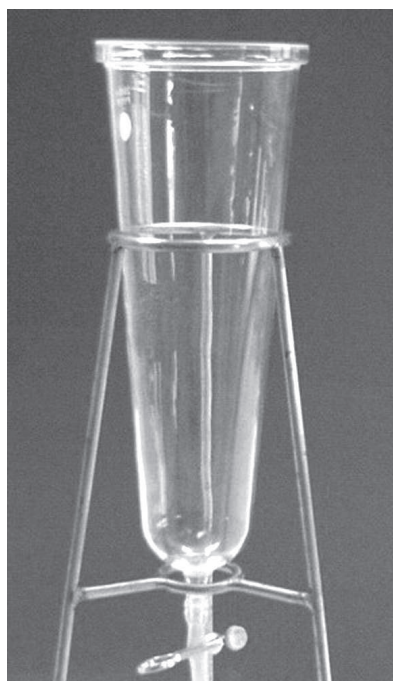
สถานที่เก็บตัวอย่าง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่ง ได้แก่ เชียงใหม่ ขอนแก่น สงขลา และชลบุรีเก็บตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวโดยแต่ละแห่งเก็บตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเส้นสด 10 ตัวอย่าง และเส้นแห้ง 10 ตัวอย่าง รวมเป็น 100 ตัวอย่างตั้งแต่ พ.ศ. 2553-2554

เครื่องมือและอุปกรณ์เครื่องแก้ว⁽⁴⁾

1. analytical balance 2 ตำแหน่ง
2. autoclave ชนิด slow exhaust โดยลดแรงดันจาก 15 ถึง 0 ปอนด์/ตารางนิ้วในเวลา 15-20 นาที

3. widefield zoom stereoscopic microscope ตรวจวิเคราะห์เริ่มที่กำลังขยาย 30 เท่า เมื่อพบวัตถุสงสัยค่อยปรับกำลังขยายเพิ่มขึ้น
4. compound microscope ใช้ตรวจจำแนกชนิดสิ่งแปลกปลอม
5. magnetic stirring bar และ stirrer-hot plate เป็นชนิดที่เคลือบด้วย teflon ขนาดยาว โดยประมาณ 47 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 9 มิลลิเมตร ใช้กับ hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง
6. ชุดเครื่องกรอง (filtration apparatus) ประกอบด้วย
 - filtering flask ขนาด 2 ลิตร
 - Hirsch funnel
 - เครื่องปั๊มสุญญากาศ
7. เครื่องทำน้ำร้อนพร้อมสายฉีด
8. percolator ขนาด 2 ลิตร ปัจจุบัน Pyrex เลิกผลิตจึงต้องสั่งทำพิเศษส่วน stand ที่ใช้ตั้ง percolator ควรสั่งทำให้เหมาะสมกับขนาดของ percolator ที่มี โดยอาจทำเป็นชั้นไม้ที่วาง percolator ได้ 6 อัน หรืออาจทำเป็นขาตั้ง stainless steel ที่วาง percolator ได้ 1 อัน สำหรับระดับความสูงของการตั้ง percolator พบว่าการตั้งบนอุปกรณ์บนพื้น จะทำงานได้สะดวกกว่าการตั้งบนโต๊ะปฏิบัติการ โดยเฉพาะเมื่อผู้วิเคราะห์เป็นสุภาพสตรีที่มีส่วนสูงไม่เกิน 160 เซนติเมตร (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Percolator ขนาด 2 ลิตรพร้อมขาตั้ง stainless steel

9. sieve no. 230 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว ควรทำจาก stainless steel และเป็นชนิด plain weave ที่มีเส้นลวดสานกันแบบชั้น 1 ลง 1
10. กระดาษกรองใช้ผลิตภัณฑ์ Whatman No. 8 Liniert/Ruled มีเส้นที่มีระยะห่าง 5 มิลลิเมตร เพื่อใช้เส้นเป็นเครื่องหมายในการตรวจนับ light filth ให้ทั่วทั้งพื้นที่ กระดาษกรองจะต้องมีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า funnel ที่ใช้กรอง โดยพับกระดาษกรองให้เป็นขอบ ป้องกัน light filth หลุดรอดไปได้กระดาษกรอง (loose material)

สารเคมี

1. 3% HCl เตรียมโดย ใช้ HCl ความเข้มข้น 36.5–38.0% จำนวน 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกรอง 970 มิลลิลิตร
2. isopropanol ความเข้มข้น 99.9% หรือ ethanol 95%
3. paraffin oil สีขาวใส มีค่า 125/135 Saybolt universal viscosity และมีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.84–0.86
4. antifoam solution – 1 g Dow Corning Antifoam A compound diluted with 20 ml. ethyl acetate ใช้ส่วนใสด้านบน และปิดฝาให้แน่น

วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนตามชนิดของสิ่งแปลกปลอม โดยวิเคราะห์ตามลำดับ ดังนี้

1. ตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมที่มองเห็นด้วยตาเปล่า⁽⁵⁾

ตรวจสอบความผิดปกติต่างๆ ที่อาจมองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic หรือ visual examination) ของบรรจุภัณฑ์ เช่น รอยกัดแทะ รูฉีกขาดของภาชนะบรรจุ หากพบสิ่งแปลกปลอมให้รายงานจำนวน หากสามารถจำแนกได้ต้องระบุชนิดและขนาด จากนั้นเปิดถุงเตี๋ยอย่างทั้งหมดโดยแบ่งตัวอย่างกระจายลงบนกระดาษสีขาว รวบรวมสิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบไว้ใน petri dish ทำการตรวจจำแนกชนิดและจำนวนสิ่งแปลกปลอม

2. ตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth

ตรวจวิเคราะห์ตามวิธี AOAC 969.41, 2012 ข้อ 16. 6. 06 Light Filth in Alimentary Pastes⁽⁴⁾ โดยทำตัวอย่างละ 6 sub-samples มีวิธีปฏิบัติดังนี้

การเตรียมและวิธีย่อยตัวอย่าง

1. สุ่มตัวอย่าง 225 กรัมต่อ subsample ลงใน beaker ขนาด 2,000 มิลลิลิตร
2. เติม 3% HCl (30 + 970) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม antifoam solution ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร
3. นำไป digest โดยเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. หลังออกจาก autoclave นำไป wet sieve โดยถ่ายส่วนผสมจาก beaker ลงใน sieve No. 230 ใช้ผ้าประปาที่ร้อน (50–70 องศาเซลเซียส) ฉีดลงไปบน sieve เพื่อล้างส่วนผสมที่ละลายในน้ำร้อนและล้างของเหลวเดิมที่อยู่ใน beaker ออกให้หมดจนน้ำล้างตัวอย่างใส
5. ถ่ายส่วนที่เหลือบน sieve ไปต้มใน paraffin oil 50 มิลลิลิตร ที่เป็นกรด โดยเติม 3% HCl 30 มิลลิลิตร กวนให้เป็น vortex (รูปกรวยหรือรูปตัววี) ด้วย magnetic stirrer hot plate เป็นเวลา 6 นาที
6. ถ่ายส่วนผสมตัวอย่างลงใน percolator ที่มีน้ำอยู่ 250 มิลลิลิตร ล้าง beaker ด้วยน้ำประปาที่ร้อนและถ่ายลงใน percolator ให้ได้ปริมาตร 1,700 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที
7. drain ของเหลวที่อยู่ใต้ชั้นน้ำมันทิ้ง ให้ได้ปริมาตร oil interface 250 มิลลิลิตร
8. เติมน้ำประปาที่ร้อนผ่านผิวด้านใน percolator เพื่อล้าง material ที่ติดอยู่ ให้ได้ปริมาตร 1,700 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2–3 นาที drain ตามข้อ 7. และให้ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง (ให้ชั้น lower layer ปราศจากหรือเกือบปราศจากอนุภาคสารแขวนลอย) ถ้ายังไม่สะอาดให้ทำต่ออีก 1 ครั้ง
9. drain ในส่วนของ interface ระหว่างน้ำมันกับน้ำให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ใน beaker ใบเดิมล้างผิวด้านใน percolator ด้วย น้ำประปาที่ร้อนหรือ alcohol หรือ isopropanol และน้ำหรือ detergent ซึ่งถ้าจำเป็นใช้ rubber policeman ทำความสะอาดผิวด้านในของ percolator

การวิเคราะห์หาสิ่งแปลกปลอม

1. นำส่วน oil interface ไปกรองด้วยชุดเครื่องกรอง
2. นำกระดาษกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope โดยเริ่มที่ก้ำก๋วย 30 เท่า และการตรวจต้องใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็กประกอบ เมื่อพบวัตถุสงสัยให้ใช้ก้ำก๋วยสูงขึ้นที่ 60-70 เท่า ซึ่งจะทำให้เห็นรายละเอียดได้มากขึ้น
3. การจำแนกชนิดสิ่งแปลกปลอมให้เขี่ยสิ่งปนปลอมจากกระดาษกรองมาอยู่บน slide แล้วตรวจโครงสร้างโดยใช้ก้ำก๋วยมากมาย เป็นร้อยเท่า ภายใต้ compound microscope เพื่อจำแนกว่าเป็นโครงสร้างของแมลงหรือขนสัตว์ชนิดใด⁽⁴⁾

เกณฑ์การตัดสินจำนวนของสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth

U.S.FDA. จะกักกันเส้นก๋วยเตี๋ยว โดยใช้เกณฑ์ DAL คือ ตัวอย่างก๋วยเตี๋ยว 6 subsamples “โดยเฉลี่ย” ตรวจพบชิ้นส่วนของแมลง หรือ ขนหนูเท่ากับหรือมากกว่า 225 ชิ้น หรือ 4.5 เส้น⁽⁶⁾

การคำนวณ

เพื่อประเมินความเสี่ยงที่จะพบสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ระหว่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสดกับเส้นแห้ง ตามสูตร⁽⁷⁾

$$RR \text{ (Risk Ratio)} = \frac{a/(a+b)}{c/(c+d)}$$

RR = อัตราส่วนความเสี่ยงของก๋วยเตี๋ยวเส้นสดที่ตกเกณฑ์ DAL กับก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้งที่ตกเกณฑ์ DAL

a = จำนวนตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสดที่ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL

b = จำนวนตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสดที่ผ่านเกณฑ์ DAL

c = จำนวนตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้งที่ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL

d = จำนวนตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้งที่ผ่านเกณฑ์ DAL

ถ้า RR = 1 แสดงว่าความเสี่ยงที่พบ light filth ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ของก๋วยเตี๋ยวเส้นสดและเส้นแห้งเท่ากัน

ถ้า RR > 1 แสดงว่าความเสี่ยงที่พบ light filth ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ของก๋วยเตี๋ยวเส้นสด มากกว่าเส้นแห้ง

ถ้า RR < 1 แสดงว่าความเสี่ยงที่พบ light filth ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ของก๋วยเตี๋ยวเส้นสด น้อยกว่าเส้นแห้ง

ผล

สิ่งแปลกปลอมที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

ตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวทั้ง 100 ตัวอย่าง (600 subsamples) ตรวจไม่พบสิ่งแปลกปลอม

สิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

พบชิ้นส่วนแมลงในตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสด และเส้นแห้งทุกตัวอย่าง ตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสด พบขนหนู ขนแมว ขนสุนัข ขนนก และขนมนุษย์ จำนวน 31, 29, 13 และ 49 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้ง พบขนหนู ขนแมว ขนสุนัข ขนนก และขนมนุษย์ จำนวน 28, 12, 9 และ 43 ตัวอย่าง ตามลำดับ จำนวนขนหนูเฉลี่ยของทั้งก๋วยเตี๋ยวเส้นสดและเส้นแห้ง คือ 0.1-1.3 เส้น ผ่านเกณฑ์ DAL ทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนและชนิดสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ที่ตรวจพบในตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวแต่ละประเภท

สิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบ	จำนวนตัวอย่าง	
	เส้นสด	เส้นแห้ง
ชิ้นส่วนแมลง	50	50
ขนหนู (เฉลี่ย 0.1-1.3 เส้น)	31	28
ขนแมว/ขนสุนัข	29	12
ขนนก	13	9
ขนมนุษย์	49	43

สำหรับผลการตรวจพบชิ้นส่วนแมลงแบ่งเป็นช่วงจำนวนโดยอิงเกณฑ์ตัดสิน DAL ที่จำนวนต่ำกว่า 225 ชิ้น และจำนวนที่เท่ากับ หรือมากกว่า 225 ชิ้น พบว่าตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสดที่พบชิ้นส่วนแมลง ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL คือ 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 58 ของตัวอย่างเส้นสดที่ตรวจทั้งหมด ส่วนก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้งที่ไม่ผ่านเกณฑ์ คือ 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 22 ของตัวอย่างเส้นแห้งที่ตรวจทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนชิ้นส่วนแมลงที่ตรวจพบในตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวแต่ละประเภท

จำนวนชิ้นส่วนแมลงที่พบ (ชิ้น)	จำนวนตัวอย่าง			
	เส้นสด	รวม (ร้อยละ)	เส้นแห้ง	รวม (ร้อยละ)
1 - 75	5		30	
76 - 150	7		7	
151 - 224	9	21 (42)	2	39 (78)
225* - 300	7		4	
301 - 400	5		2	
401 - 500	-		-	
501 - 600	7		2	
601 - 700	5		2	
701 - 800	-		1	
901 - มากกว่า 1000	5	29 (58)	-	11 (22)

หนึ่งก๋วยเตี๋ยวเส้นสด 4 ตัวอย่าง ตรวจพบ light filth 5 ประเภท ในตัวอย่างเดียวกัน คือพบชิ้นส่วนแมลง 107-204 ชิ้น ขนหนู 0.1-0.5 เส้น ขนแมว สุนัข 0.1-0.5 เส้น ขนนก 0.1-0.3 เส้น ขนมนุษย์ 0.5-1.1 เส้น ส่วนก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้ง 4 ตัวอย่างพบชิ้นส่วนแมลง 57-101 ชิ้น ขนหนู 0.1-0.7 เส้น ขนแมว สุนัข 0.1 เส้น ขนนก 0.1-0.3 เส้น ขนมนุษย์ 0.3-3.0 เส้น

การคำนวณอัตราความเสี่ยงที่จะพบชิ้นส่วนแมลงไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ระหว่างก๋วยเตี๋ยวเส้นสดกับเส้นแห้ง

พบว่าเท่ากับ
$$= \frac{29/50}{11/50} = 2.63$$
 แสดงว่าก๋วยเตี๋ยวเส้นสด มีความเสี่ยงที่จะพบชิ้นส่วนแมลงไม่ผ่านเกณฑ์มากกว่าเส้นแห้ง 2.63 เท่า

วิจารณ์

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นเหมาะกับการดำรงชีวิตและเจริญพันธุ์ของแมลง ปลายข้าวที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวก็เป็นอาหารที่ดี จึงเป็นปัจจัยเสริมที่ทำให้พบชิ้นส่วนแมลงในตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวทุกตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่จำนวนชิ้นส่วนแมลงตกเกณฑ์ DAL ของเส้นสด ร้อยละ 58 เส้นแห้ง ร้อยละ 22 โดยเส้นสดมีความเสี่ยงที่จะตกเกณฑ์สูงกว่าเส้นแห้ง 2.63 เท่า มีข้อสังเกตว่าการจำหน่ายก๋วยเตี๋ยวเส้นสดจะอยู่ในลักษณะการแบ่งขายตามปริมาณที่ผู้ซื้อต้องการ คือ ไม่ได้อยู่ในภาชนะบรรจุของโรงงาน จึงไม่ปรากฏชื่อ ที่อยู่ของผู้ผลิตทำให้ผู้ผลิตไม่เข้มงวดในด้านสุขลักษณะการผลิต จึงควรมีเกณฑ์บังคับตามกฎหมาย เรื่อง ฉลาก ของก๋วยเตี๋ยวเส้นสด

การตรวจพบ light filth 5 ประเภท ในตัวอย่างเดียวกันของก๋วยเตี๋ยวเส้นสด เส้นแห้งคือพบชิ้นส่วนแมลง หนอน หนอน หนอน และหนอน หนอน ถึงแม้ว่าจำนวนชิ้นส่วนแมลง และหนอน ต่ำกว่าเกณฑ์ DAL แต่การพบสิ่งแปลกปลอมหลายประเภทในตัวอย่างเดียวกันซึ่งเกณฑ์กำหนด DAL ครอบคลุมไปไม่ถึง แต่ U.S.FDA. จะใช้การพิจารณาเป็นแต่ละกรณีไป ซึ่งกรณีดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุการกักกันสินค้า แม้ว่าการส่งออกจะเป็นผลิตภัณฑ์เฉพาะก๋วยเตี๋ยวเส้นแห้ง แต่สำหรับก๋วยเตี๋ยวเส้นสดที่บริโภคภายในประเทศพบการปนเปื้อนของ light filth ในปริมาณมาก ก็อาจพิจารณาได้ว่าไม่เหมาะสมในการนำไปบริโภคเช่นเดียวกัน เนื่องจากบ่งชี้ถึงกระบวนการผลิตที่ไม่ดีขาดการป้องกันแมลงและสัตว์พาหะ⁽²⁾

การแก้ไขปัญหาการปนเปื้อน light filth ในเส้นก๋วยเตี๋ยวสิ่งที่สำคัญมากที่สุด คือการป้องกันไม่ให้ light filth ปนเปื้อนลงไปในผลิตภัณฑ์ เริ่มจากการใช้วัตถุดิบที่ปราศจากการปนเปื้อน หรือมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด ดังนั้น ปลายข้าว/ข้าวหัก ที่จะนำมาไม่ทำแป้ง ถ้าสามารถนำไปผ่าน เครื่องยีส (sorting) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสิ่งแปลกปลอม จะช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากกระบวนการผลิต จากนั้นจะต้องเก็บวัตถุดิบในภาชนะปิดสนิทและรักษาบริเวณผลิต บริเวณเก็บวัตถุดิบให้สะอาดอยู่เสมอ ทำเส้นสีขาวกว้างอย่างน้อย 15 เซนติเมตร บนพื้นส่วนที่อยู่ติดผนัง เพื่อสังเกตร่องรอยสัตว์และแมลง วิธีนี้แม้ทำให้เสียพื้นที่ไปบางส่วนแต่ก็เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด⁽²⁾

สำหรับการป้องกันแมลงและสัตว์หอนที่ใช้ในการผลิตต้องบดด้วยมุ้งลวดหรือตาข่าย มุ้งลวดที่ติดกับขอบหน้าต่างจะต้องพอดีกับกรอบและสามารถถอดล้างทำความสะอาดได้ การป้องกันหนูทำโพรงหรือซุกตัวเข้าสู่ตัวอาคารต้องคำนึงถึงผนังรากตึก ควรทำเป็นรูปตัว L (sunken wall)⁽²⁾ คือ ฝังรากลงในดินอย่างน้อย 2 ฟุต ปลายยื่นมาแนวนอน 1 ฟุต ส่วนขอบบนของผนังตึกควรสูงกว่าระดับพื้นดินอย่างน้อย 1 ฟุต สำหรับประตูไม้ตามขอบด้านล่างควรหุ้มด้วยโลหะเพื่อป้องกันหนูทะลุ

ทางเข้าออกของบริเวณผลิตโดยทั่วไปนิยมใช้ม่านพลาสติกป้องกันแมลงและอาจมีพัดลมเป่าและต้องมีประตูปิดอีกชั้นหนึ่งซึ่งต้องปิดหลังจากสิ้นสุดการผลิตในแต่ละวัน เพื่อป้องกันหนูและสัตว์อื่นเข้ามาในบริเวณผลิตเมื่อมีระบบป้องกันที่ดีแล้ว ต้องมีการตรวจตราซ่อมแซมระบบดังกล่าวอย่างสม่ำเสมอ เช่น มุ้งลวดอาจจะขาดทะลุ หรือแผ่นเหล็กที่ใช้ปิดทางเข้าออกของหนูเกิดผุกร่อนเป็นต้น ส่วนการปนเปื้อนของมนุษย์ป้องกันโดยพัฒนาสุขลักษณะส่วนบุคคล คือ การสวมถุงมือและใช้เน็ตคลุมผม

สรุป

การป้องกันไม่ให้มีสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ต้องปฏิบัติอย่างเป็นองค์รวมทั้งระบบไม่ใช่ทำแต่เพียงส่วนใดส่วนหนึ่งจึงจะประสบความสำเร็จได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยผู้บริหารสูงสุดของโรงงานจะต้องมีนโยบายเพื่อนำไปสู่การปฏิบัติในการที่จะป้องกันไม่ให้มีสิ่งแปลกปลอมในผลิตภัณฑ์ของตน ผลตอบแทนที่ได้รับ นอกจากจะเป็นการเสริมสร้างชื่อเสียง ความน่าเชื่อถือของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคจะได้รับประทานเส้นก๋วยเตี๋ยวที่สะอาดแล้วยังสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์ไปจำหน่ายยังตลาดสำคัญ คือ สหรัฐอเมริกาได้

การตรวจโรงงานเพื่อให้การรับรอง GMP ตามข้อกำหนดที่อยู่ในบัญชีแนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 193) พ.ศ. 2543 เรื่อง วิธีการผลิตเครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิตและการเก็บรักษาอาหาร ควรเพิ่มการตรวจ light filth ในผลิตภัณฑ์ว่าต้องผ่านเกณฑ์ DAL ด้วย จะเป็นการยกระดับการผลิต ให้เกิดความเชื่อมั่นเพิ่มขึ้นว่า ผลิตภัณฑ์มีความสะอาด ถูกสุขลักษณะเหมาะสมต่อการบริโภคอย่างแท้จริง

เอกสารอ้างอิง

1. ก้วยเตี่ยว. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 9 กันยายน 2556]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก URL: <http://th.wikipedia.org/wiki/ก้วยเตี่ยว>
2. Gorham JR, Editor. Ecology and Management of Food-Industry Pests. Virginia: Association of Official Analytical Chemists; 1991. p. 288, 331-3, 491-4.
3. Import alert 02-02. [online] 2013; [cited 2013 Sep 9]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_2.html
4. Chapter 16: Extraneous materials: isolation. In: Latimer GW, Editor. Official method of analysis of AOAC International. 19th ed. Gaithersburg, MD.: AOAC International; 2012. p. 1-5, 27.
5. Chapter V-2: Bakery products, cereals, and alimentary pastes. In: FDA technical bulletin number 5, Macroanalytical Procedures Manual. Alameda, CA.: U.S. Food and Drug Administration; 1984. p. V-12.
6. U.S. Department of Health and Human Services. The Food Defect Action Levels. [online]. 2005; [cited 2013 Sep 9]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/ucm056174.htm>
7. ศรีอนันต์ วรรณเสน. เอกสารการสัมมนาเรื่องการประเมินความเสี่ยงต่อเชื้อก่อโรคในอาหารเบื้องต้น (Microbial Risk Assessment of Pathogens in food); วันที่ 14-15 พฤษภาคม 2556. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2556.

Risk Assessment of Light Filth in Rice Noodle

**Tanongpan Satjapala Kuntong Pednog Kokeiat Sarttarin
and Kanogwan Toonsakool**

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT Noodle is a historical favorite food. Besides it is a value added product which is exported to many countries, included the United States of America (US); one of the main market. Whereas there is no information on light filth in noodle whilst light filth is an objectionable matter; such as rat hair, cat/dog hair, insect fragments etc. And it occurred that US. Food and Drug Administration detained the Thai noodle consignments because of this matter. Therefore, in 2553-2554 B.E., Department of Medical Sciences undertook risk analysis of light filth in fresh and dry noodle, 50 samples each and 6 sub-sample each sample. The results shown that every sample was contaminated by light filth. The risk ratio of light filth between fresh and dry noodle which fail defect action level (DAL: 225 insect fragments) was 2.63 (58% and 22% respectively). The average of rat hairs, 0.1-1.3 hairs, were below DAL (4.5 hairs). The preventive measures against elements that lead to contamination is the most important aspect. Such measures start with raw material control, good housekeeping, closing all openings for pest exclusion and personal hygiene. For fully effective, all measures must be conducted integrately. The upshots of strengthening the good manufacturing practices are not only providing sanitary noodle to the consumers but the products could also be exported to US. with no detention.

Key Words: Risk assessment, light filth, Rice noodle

การทดสอบความถูกต้องของวิธี Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ วิชชุดา จริยะพันธุ์ และสายวรุฬ จตุรกิตตินันท์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

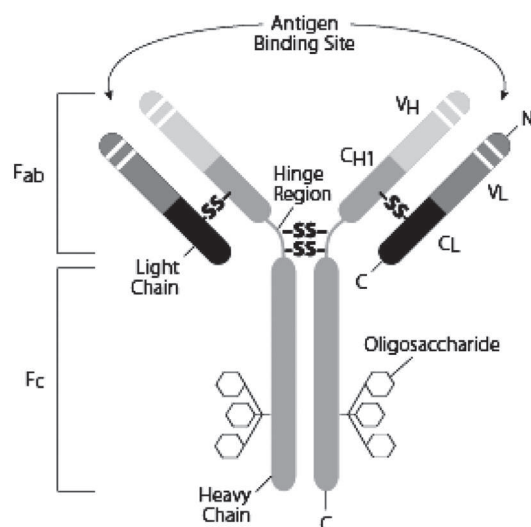
บทคัดย่อ Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนเชิงคุณภาพโดยสามารถใช้แยกโปรตีนได้ตามขนาดโมเลกุลที่นิยมใช้กันมากเพื่อตรวจวิเคราะห์ยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (biotherapeutic products) ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAbs) การศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี CE-SDS ในการตรวจเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุ โดยใช้ชุดเครื่องมือ Beckman PA 800, capillary bare-fused silica, SDS-MW Gel buffer ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบ photodiode array (PDA) ที่ความยาวคลื่น 220 nm พบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการแยกที่ดี สามารถตรวจสอบสารที่ปนเปื้อนมากับตัวยาสีววัตถุ เช่น non-glycosylated heavy chain: NGHC ได้ โดยมีความจำเพาะและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด คือมีค่า % RSD ของ migration time (MT) และ corrected percentage area ของ light chain: LC, heavy chain: HC และ NGHC น้อยกว่าร้อยละ 3 และมีความคงทน โดยการทดลองเปลี่ยนเจลและท่อแคปิลลารีพบว่า MT ของ heavy chain และ NGHC จากท่อแคปิลลารีใหม่เท่านั้นที่มีค่า % RSD มากกว่า 3 เล็กน้อย เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างจริงชนิด mAbs พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานสนับสนุนว่าวิธี CE-SDS นี้เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยา mAbs ที่จำหน่ายในประเทศไทย

Accepted for publication, 26 June 2014

บทนำ

ปัจจุบันยาชีววัตถุที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ^(1, 2) มีปริมาณและคุณภาพสูงขึ้น สามารถนำมาใช้ในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยาชีววัตถุที่ใช้เพื่อการรักษาโรค (biotherapeutic products) ดังกล่าวมีหลายประเภท ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: mAb) โปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), blood clotting factor VIII ยาในกลุ่มฮอร์โมน ได้แก่ erythropoietin, insulin ยาในกลุ่มเอนไซม์ ได้แก่ urate oxidase, glucosidase รวมถึงเปปไทด์ต่างๆ ยาชีววัตถุเหล่านี้มีกระบวนการสร้างและผลิตที่ซับซ้อนในเซลล์สิ่งมีชีวิต ตลอดจนต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ จึงต้องมีการออกแบบและควบคุมการผลิตเป็นอย่างดีเพื่อให้มั่นใจว่าจะได้ยาที่มีคุณภาพตามที่กำหนด การตรวจวิเคราะห์คุณภาพจึงเป็นหัวใจสำคัญในการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการนำมาใช้เพื่อการรักษา^(3, 4)

โมเลกุลของแอนติบอดีประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (light chain: LC) 2 สาย และโปรตีนสายยาว (heavy chain: HC) 2 สาย เชื่อมกันเป็นรูปตัววาย (Y shape) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และมีโมเลกุลน้ำตาลประกอบอยู่บน HC⁽⁵⁾ (glycosylated HC) (ภาพที่ 1)⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นการปรับแต่งโมเลกุลหลังจากการสร้างโปรตีนของเซลล์ (post-translational modification)^(5, 7, 8) โดยชนิดและรูปแบบการเรียงตัวของหมู่ น้ำตาลในการเกิด glycosylation จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ โดยเซลล์ที่นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งผลิต ได้แก่ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และยีสต์ นอกจากนั้นสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิต วิธีการเลี้ยงเซลล์ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ แอนติบอดีที่มีการออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพควรเป็นโมเลกุลเดี่ยวที่สมบูรณ์ (monomer) แต่เนื่องจากในกระบวนการสร้าง mAb ในเซลล์ กระบวนการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์รวมทั้งในขั้นตอนการเก็บรักษาอาจทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะต่างๆ เช่น เกิดการแตกของโมเลกุล (fragmentation) หรือการเกาะกลุ่มกันของโมเลกุลแอนติบอดี (aggregation)^(3, 9) รวมทั้งการเกิดโมเลกุลที่สภาพไม่สมบูรณ์เนื่องมาจากไม่มีการเติมน้ำตาลที่ HC ซึ่งมีผลต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ของแอนติบอดี และทำให้ได้เป็น non-glycosylated heavy chain: NGHC ซึ่งโมเลกุลชนิดนี้จัดเป็นสารปนเปื้อนที่มาพร้อมกับตัวยา (product-related impurities) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการควบคุมปริมาณ NGHC นี้^(10, 11)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของแอนติบอดี และหมู่ น้ำตาล บน HC

การวิเคราะห์เอกลักษณ์จากคุณลักษณะของโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานและการตรวจสอบความบริสุทธิ์เป็นส่วนสำคัญในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาชีววัตถุ เนื่องจากสามารถแสดงให้เห็นถึงคุณภาพของยาและความสม่ำเสมอของกระบวนการผลิต การเก็บและการขนส่งที่เหมาะสมของยา⁽¹²⁾ โดยตำรายาสากลแนะนำให้ตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาเหล่านี้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ต่างกันมากกว่า 1 วิธี⁽¹³⁾ เพื่อให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูปมีคุณภาพตามที่กำหนดโดยดูจากผลการวิเคราะห์ว่าเป็นไปตามข้อกำหนดและสอดคล้องกัน วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นิยมใช้ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟี และอิเล็กโทรโฟรีซิส^(13, 14) เช่น size exclusion chromatography (SEC-HPLC), reversed-phase chromatography (RP-HPLC), sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), isoelectric focusing (IEF) และ capillary electrophoresis (CE)⁽¹⁵⁾ เป็นต้น

Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนที่ใช้หลักการเดียวกับ SDS-PAGE แบบเจลโดยพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นกว่าวิธี SDS-PAGE ซึ่งมีข้อจำกัดในการใช้เวลานานในการเตรียมเจล ความยุ่งยากในการวิเคราะห์รวมทั้งมีการใช้สารเคมีที่อันตราย^(16, 17) ปัจจุบัน CE-SDS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ระบุไว้ใน European Pharmacopoeia⁽³⁾ ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพยาโปรตีนในการควบคุมคุณภาพยาชีววัตถุชนิด mAb ด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์โดยการตรวจสอบปริมาณโมเลกุลแอนติบอดีที่สมบูรณ์และผลรวมของ LC และ HC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งผู้ผลิตจะกำหนดเป็นค่าร้อยละที่เหมาะสมสำหรับยาแต่ละชนิด หลักการของ CE-SDS คือ SDS จะจับกับโมเลกุลโปรตีนทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพโครงสร้างแบบทุติยภูมิและตติยภูมิได้เป็นสายของกรดอะมิโน เมื่อผ่านเข้าไปในท่อแคปิลลารีจะเกิดการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกแยกออกมาก่อน ตามด้วยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (migration time: MT) ของแต่ละโมเลกุลจะเป็นค่าเฉพาะ โดยจะปรากฏพีคที่มีความสูงแปรตามตามจำนวนของโมเลกุลที่แยกได้โดยปริมาณของสารที่แยกได้นี้จะถูกคำนวณเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (corrected percentage area) ต่อไป โดยวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ในสภาวะ non-reducing เพื่อตรวจสอบปริมาณของโมเลกุลชนิด monomer หรือวิเคราะห์ในสภาวะ reducing โดยการสลายโครงสร้างของโมเลกุลแอนติบอดี โดยการตัดพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลแอนติบอดี ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีพีคของ LC และ HC ที่แยกออกจากกัน จากผลการวิเคราะห์จะทำให้ทราบว่ายา mAb มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดหรือไม่^(18, 19) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของ CE-SDS เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศร่วมกับวิธีอื่นในการตรวจเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาชนิด mAb ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) ประกอบด้วยชุดคอมพิวเตอร์ และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch มีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด photodiode array (PDA) และแคปิลลารีแบบ uncoated ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 μ m ยาว 30.2 cm

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป และสารมาตรฐาน

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป : SDS-MW analysis kit (Beckman coulter, USA) ประกอบด้วยโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 10-225 kDa และ internal standard (IS) ขนาด 10 kDa, Gel buffer (proprietary formulation, pH 8, 0.2% SDS), sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% SDS),

acidic wash solution (0.1 N HCl), basic wash solution (0.1 N NaOH), 2-mercaptoethanol (BIO-RAD, US), DTT (GE, US), iodoacetamide (GE, US), milli-Q water

สารมาตรฐาน : สารมาตรฐาน mAb และ G-CSF จากบริษัทฯ ผู้ผลิตตัวอย่างชนิดนั้นๆ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธีเป็นยาชีววัตถุเพื่อการรักษา 2 กลุ่ม คือ mAb ชนิด A ซึ่งผลิตจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) และ granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) ที่ผลิตจาก *E. coli* จำนวน 1 ชนิด สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ตัวอย่าง mAb ชนิด B และ C ซึ่งเป็นยาชีววัตถุเพื่อการรักษาที่ส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนยา

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะ **non-reducing**

เจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.2–2.0 mg/ml ด้วย sample buffer เติม IS ปริมาตร 2 µl และ 250 mM iodoacetamide ปริมาตร 5 µl ลงในตัวอย่างปริมาตร 95 µl นำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบ

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะ **reducing**

เจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.2–2.0 mg/ml ด้วย sample buffer เติม IS ปริมาตร 2 µl และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 5 µl ลงในตัวอย่างปริมาตร 95 µl นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบ

วิธีวิเคราะห์

นำสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ ฉีดเข้าเครื่อง CE ขั้นตอนการแยกสารของ CE-SDS ประกอบด้วยการสลายโมเลกุลโปรตีนด้วยความร้อนในสภาพที่มี SDS จากนั้นนำไปผ่านแคปิลลารีโดยมีชุดน้ำยาโปรตีนที่มีน้ำหนักมาตรฐานในช่วง 10, 20, 35, 50, 100, 150, และ 225 kDa และ ใช้ IS ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 10 kDa เติมในตัวอย่างเพื่อเป็น mobility marker โดยมีสภาวะของเครื่อง (ตารางที่ 1) และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง CE ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ CE-SDS ในขั้นตอนการทำงานขั้นตอนต่างๆ

step#	event	value	duration	comments
1	rinse-pressure	70.0 psi	3.00 min	0.1 N NaOH rinse
2	rinse-pressure	70.0 psi	1.00 min	0.1 N HCl rinse
3	rinse-pressure	70.0 psi	1.00 min	H ₂ O rinse
4	rinse-pressure	70.0 psi	10.00 min	SDS gel rinse
5	wait		0.00 min	H ₂ O dip
6	wait		0.00 min	H ₂ O dip
7	inject -voltage	5.0 kV	20.0 sec	sample injection
8	wait		0.00 min	H ₂ O dip
9	separate -voltage	15.0 kV	30.00 min	separation

การหาความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณสารที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

ก่อนการทดสอบความถูกต้องของวิธีได้ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณสารตัวอย่างต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb A ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนที่ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/ml และหาปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมในการฉีดเข้าเครื่อง CE โดยใช้ mAb A และตั้งค่าปริมาตรฉีดที่ 5, 10, 20, 40 และ 80 วินาที ตามลำดับ

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method of Validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

1.1 วิเคราะห์ blank, blank ที่เติม IS, โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน และโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่เติม IS แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ เพื่อดูความสามารถในการแยกของสภาวะที่กำหนด

1.2 วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb และ G-CSF ที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 1 mg/ml และสารมาตรฐานของตัวอย่างนั้น ๆ ที่เตรียมโดยใช้สภาวะ non-reducing และ reducing แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้

2. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

2.1 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

System precision วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb โดยทดสอบตัวอย่างละ 6 ซ้ำ โดยทดสอบภายในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC และคำนวณ %RSD ของแต่ละค่าที่ได้ ซึ่งต้องมีค่าไม่มากกว่า 3

Method precision วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ที่เตรียมจำนวน 6 หลอด ทดสอบหลอดละ 1 ครั้ง ในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC และคำนวณ %RSD ของแต่ละค่าที่ได้ ซึ่งต้องมีค่าไม่มากกว่า 3

2.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision)

วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวันเป็นเวลา 3 วัน และเปลี่ยนนักวิเคราะห์จำนวน 2 คน คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC ทั้ง 3 วัน และคำนวณ %RSD ของแต่ละค่าที่ได้ ซึ่งต้องมีค่าไม่มากกว่า 3

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

3.1 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยน SDS-MW analysis kit โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb จำนวน 6 ซ้ำ โดยใช้ SDS MW analysis kit จำนวน 2 รุ่น คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้ kit ทั้งสองชุด

3.2 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารี โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb จำนวน 6 ซ้ำ กับแคปิลลารีจำนวน 2 ท่อ คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้แคปิลลารีทั้งสองท่อ

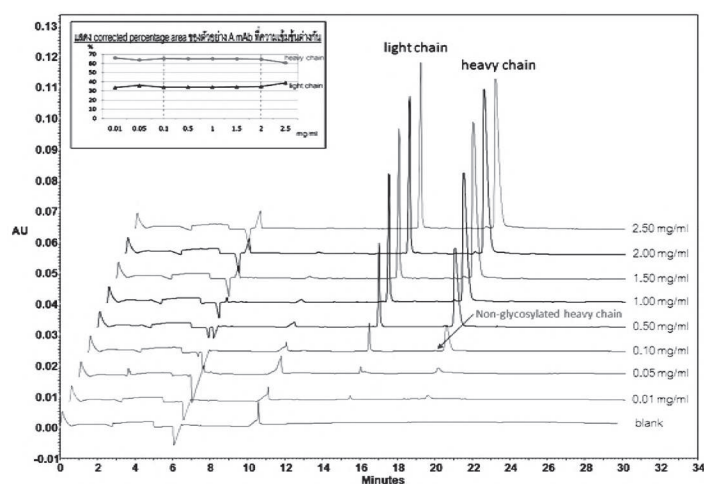
การทดสอบตัวอย่างยา mAb

วิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของตัวอย่างยา mAb ชนิด B และ C ที่ส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียน

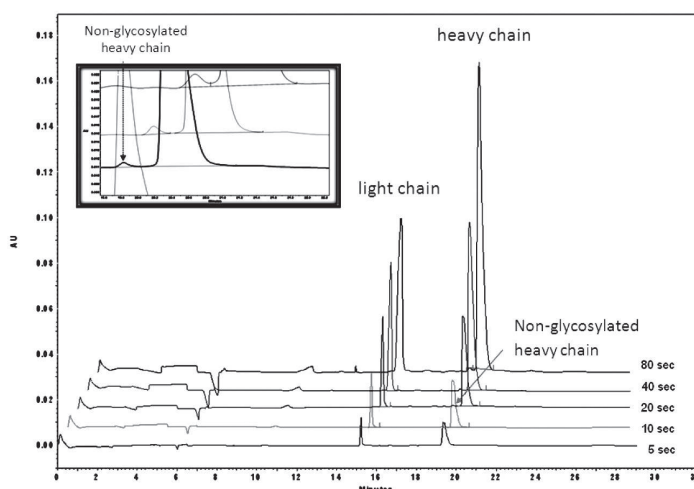
ผล

การหาความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณสารที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

จากการเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 0.01–2.50 mg/ml พบว่าสามารถตรวจพบทั้ง LC, HC และ NGHC ได้ชัดเจนตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ขึ้นไป (ภาพที่ 2) และเมื่อปริมาณโปรตีนเพิ่มความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับ ส่วนปริมาณ mAb ที่ฉีดเข้าเครื่องจาก 5 ถึง 80 วินาที พบว่ามีความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นกัน (ภาพที่ 3) แต่ปรากฏพีคของ NGHC ได้ตั้งแต่การฉีดสาร 20 วินาทีขึ้นไป



ภาพที่ 2 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ reducing ที่มีปริมาณโปรตีน 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/ml ตามลำดับ

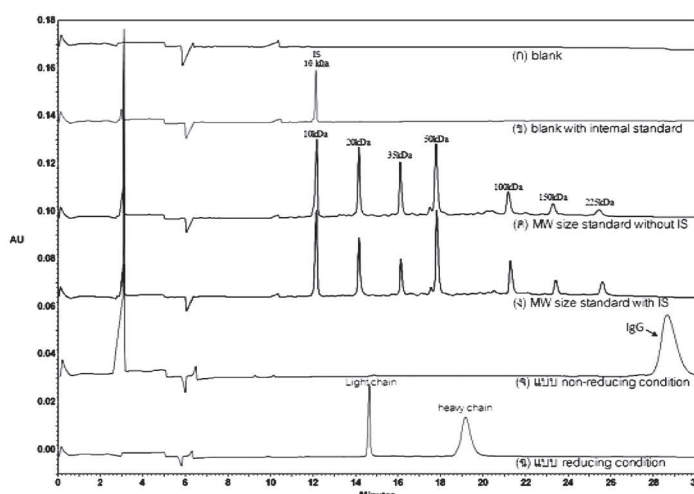


ภาพที่ 3 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ reducing ที่กำหนดปริมาตรฉีดเป็น 5, 10, 20, 40 และ 80 วินาที ตามลำดับ

1. ความจำเพาะของวิธี CE-SDS

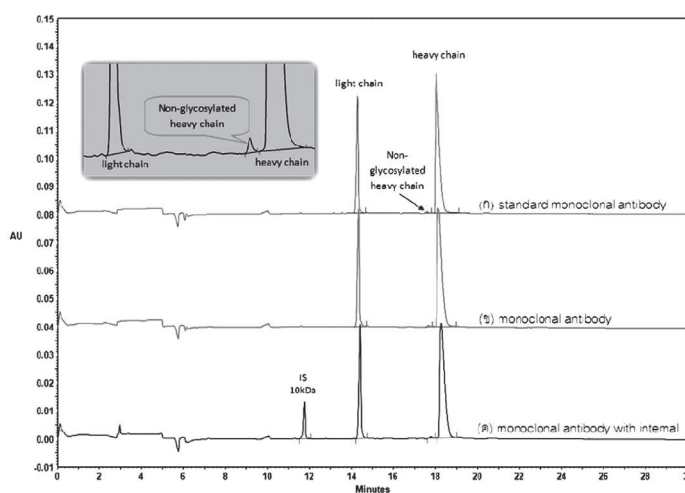
จากการวิเคราะห์ blank พบว่าไม่มีพีคอื่นปรากฏนอกจากพีคของสารละลาย buffer และ blank ที่เติม IS พบพีคของ IS ปรากฏชัดเจน และตรงกับโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่ 10 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ IS (ภาพที่ 4 ก ข และ ค) สำหรับกรณีเติม IS ลงในโปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน พบว่าความสูงของพีคที่ตำแหน่ง 10 kDa สูงกว่ากรณีไม่เติม IS (ภาพที่ 4ง)

ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ชนิด A ที่เตรียมในสภาวะ reducing ปรากฏพีคของ LC และ HC แยกออกจากกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4ฉ) และในสภาวะ non-reducing ปรากฏพีคของ intact molecule ของ mAb ชนิด A (ภาพที่ 4จ) โดยไม่มีพีคอื่นปรากฏเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบพีคปรากฏที่ MT เดียวกัน

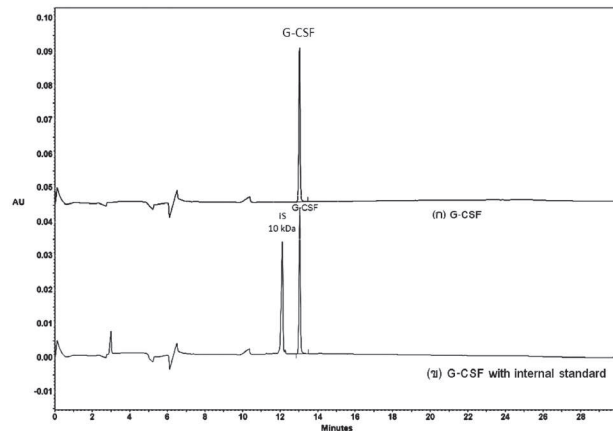


ภาพที่ 4 Electropherogram ของ blank (ก) เปรียบเทียบกับ blank ที่เติม IS (ข) โปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่ไม่เติม IS (ค) และเติม IS (ง) ตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ non-reducing (ฉ) และในสภาวะ reducing (จ)

เมื่อวิเคราะห์ mAb ชนิด A และ G-CSF ในสภาวะ reducing โดยเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่ามี MT ตรงกับสารมาตรฐานเช่นเดียวกันทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 5 และ 6) ตามลำดับ และในกรณีเติม IS ลงในตัวอย่าง จะพบพีคของ IS ที่ตำแหน่ง 10 kDa ทุกครั้ง และไม่รบกวนพีคของสารตัวอย่าง



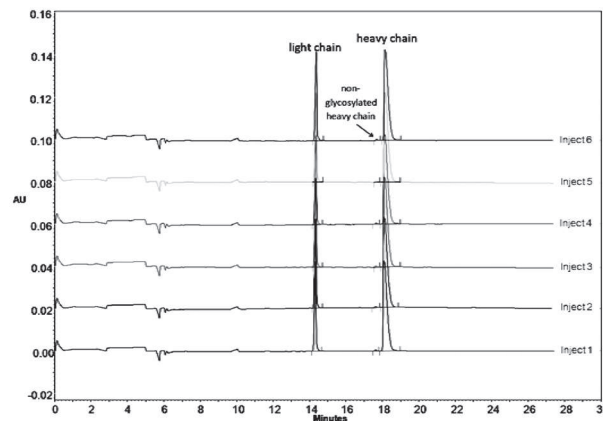
ภาพที่ 5 Electropherogram การศึกษาความจำเพาะของวิธีจากตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ reducing



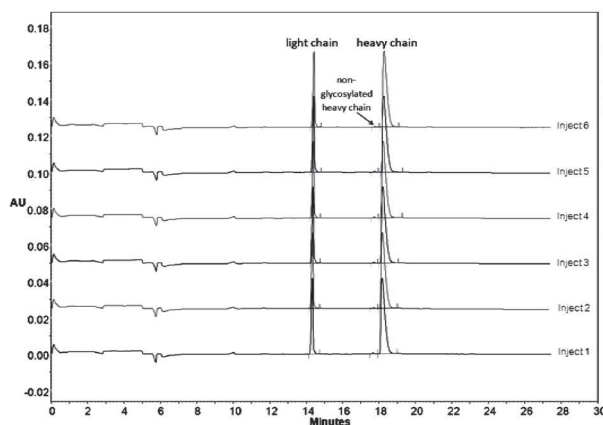
ภาพที่ 6 Electropherogram การศึกษาความจำเพาะของวิธีจากตัวอย่าง G-CSF ในสภาวะ reducing

2. ความเที่ยง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ ในแต่ละหัวข้อการทดสอบ คือ ความเที่ยงในวันเดียวกันได้ electropherogram ที่ตำแหน่งตรงกันของทั้ง 6 ครั้ง (ภาพที่ 7 และ 8) และคำนวณปริมาณ LC, HC และ NGHC ของ mAb ชนิด A รวมทั้งผลของความเที่ยงระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน และความแม่นยำจากการวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ 2 คน (ตารางที่ 2) โดยที่ค่า % RSD น้อยกว่า 3



ภาพที่ 7 Electropherogram ในสภาวะ reducing ของ Repeatability (system precision) จาก mAb ชนิด A



ภาพที่ 8 Electropherogram ในสภาวะ reducing ของ Repeatability (method precision) จาก mAb ชนิด A

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงด้วย mAb ชนิด A และการวิเคราะห์จากนักวิเคราะห์ 2 คน

parameters		migration time (min)			corrected percentage area (%)		
		LC	NGHC	HC	LC	NGHC	HC
repeatability (system precision) N = 6	Average	14.35	17.66	18.11	34.07	0.44	65.49
	% RSD	0.14	0.12	0.13	0.05	1.97	0.03
repeatability (method precision) N = 6	Average	14.29	17.62	18.13	34.56	0.44	65.01
	% RSD	0.27	0.27	0.29	0.05	1.99	0.03
intermediate precision, between-days 3 days N = 18	Average	14.61	17.99	18.49	34.18	0.44	65.38
	% RSD	2.41	2.45	2.54	0.36	2.96	0.20
intermediate precision, 2 analysts	Average	14.46	17.80	18.28	34.19	0.44	65.37
	% RSD	0.86	0.87	1.01	0.39	2.27	0.21

3. ความคงทนของวิธีวิเคราะห์

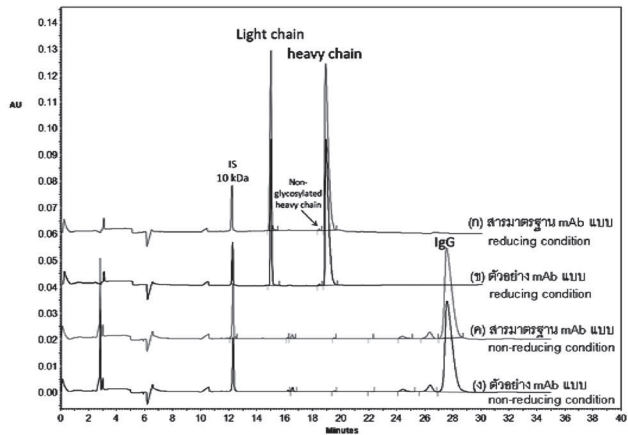
เมื่อตรวจสอบความคงทนของวิธีโดยการเปลี่ยนแปลง analysis kit รุ่นใหม่ พบว่าผลการวิเคราะห์ตัวอย่างของ analysis kit อยู่ในเกณฑ์ที่ดี (ตารางที่ 3) มีค่า %RSD ของทั้ง MT และ corrected percentage area น้อยกว่า 3

ผลของการตรวจสอบความคงทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารีใหม่เปรียบเทียบกับท่อเดิม พบว่าพีคของ HC และ LC มีค่า %RSD น้อยกว่า 4 ทั้ง MT และ corrected percentage area (ตารางที่ 3)

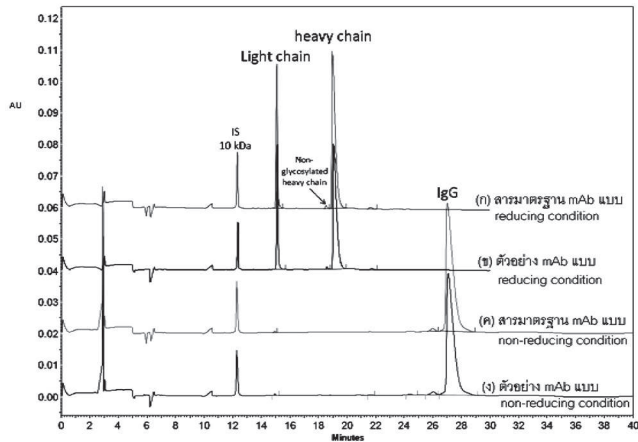
ตารางที่ 3 การทดสอบความคงทนของ analysis kit และแคปิลลารี จากการวิเคราะห์ mAb ชนิด A

parameters		migration time (min)			corrected percentage area (%)		
		LC	NGHC	HC	LC	NGHC	HC
robustness ต่าง analysis kit	Average	14.72	18.13	18.62	34.11	0.44	65.45
	%RSD	2.65	2.71	2.87	0.18	1.83	0.10
robustness ต่าง capillaries	Average	14.76	18.19	18.68	34.32	0.44	65.24
	%RSD	2.92	3.05	3.22	0.79	2.82	0.41

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างจริงทั้ง mAb ชนิด B และ C ตามสภาวะของวิธี CE-SDS ที่ได้ตรวจสอบแล้วนี้ ทั้ง 2 ชนิด ให้ electropherogram ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 9 และ 10) และสามารถคำนวณปริมาณ LC และ HC (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 9 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด B เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ในสภาวะ non-reducing และ reducing



ภาพที่ 10 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด C เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในสภาวะ non-reducing และ reducing

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบในตัวอย่าง mAb ชนิด B และ C

ตัวอย่าง	migration time (min)			corrected percentage area (%)			
	non-reducing condition		reducing condition	non-reducing condition		reducing condition	
	IgG	LC	HC	IgG	LC	HC	LC+HC
mAb ชนิด B	27.10	15.16	19.09	97.45	31.47	67.46	98.93
SD	0.03	0.04	0.05	0.29	0.05	0.04	0.01
% RSD	0.10	0.23	0.26	0.30	0.16	0.06	0.01
mAb ชนิด C	27.61	14.91	18.81	91.69	33.44	66.21	99.64
SD	0.02	0.00	0.01	0.13	0.36	0.36	0.00
% RSD	0.08	0.00	0.04	0.15	1.08	0.54	0.00

วิจารณ์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ CE-SDS นี้ ได้ทดลองใช้สภาวะของวิธีตามที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว⁽¹⁶⁾ (ตารางที่ 1) รวมทั้งความยาวของแคปิลลารี คือ 30.2 cm และอุณหภูมิสำหรับการเชื่อม SDS กับโมเลกุลโปรตีนที่ 70 °C นาน 3 นาที⁽¹⁷⁾ ผลที่ได้ให้ค่าต่างๆ ทางสถิติเหมาะสม จึงได้กำหนดเป็นสภาวะจริงเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และใช้ IS ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานขนาด 10 kDa เป็นตัวบ่งชี้การเคลื่อนที่ (mobility marker) เพื่อความถูกต้องของการอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่าง

จากทดลองหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ พบว่าพีคของ NGHC ซึ่งมีปริมาณน้อยจะปรากฏให้เห็นเมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างตั้งแต่ 0.1 mg/ml (ภาพที่ 2) ดังนั้นจึงเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างและเมื่อพิจารณาค่า log ของความเข้มข้นของโปรตีนที่ศึกษา พบว่าค่าความเข้มข้นโปรตีนระหว่าง 0.1–2.0 mg/ml มีกราฟเป็นเส้นตรง (ภาพที่ 2 ในกรอบ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นในช่วงค่านี้เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์⁽¹⁹⁾ และจากการทดลองหาปริมาตรสารที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โดยทดลองฉีดตัวอย่าง mAb เข้าเครื่อง CE-SDS เป็นช่วงเวลา 5–80 วินาทีนั้น พบว่าความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 3) ปริมาตรที่น้อยที่สุดและปรากฏพีคของ NGHC ที่สามารถมองเห็นคือ ที่การฉีด 20 วินาที ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นโปรตีนที่ 0.2 mg/ml และปริมาตรการฉีดสาร 20 วินาที ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี CE-SDS นี้

ผลการทดสอบสภาวะของวิธีที่กำหนดนี้ให้ผลทั้งความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีอย่างเหมาะสม สามารถแยกโปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 10–225 kDa ได้ดี เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb (ภาพที่ 4 จ–ฉ) ในสภาวะ non-reducing เพื่อดูโมเลกุลชนิด monomer ของแอนติบอดีและในสภาวะ reducing ซึ่งมีการตัดไธซัลไฟด์บอนด์ในโมเลกุลแอนติบอดีเพื่อแยก LC และ HC พบว่ามีการแยกของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดในตำแหน่งที่ชัดเจนรวมทั้งสามารถแยก NGHC ได้ (ภาพที่ 5) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ G-CSF ซึ่งเป็นโปรตีนสายเดี่ยวน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18.8 kDa และไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ ในสภาวะ reducing พบว่าแสดงผลเป็นโมเลกุลโปรตีนสายเดี่ยวที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 6) ผลการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันและระหว่างวัน (ภาพที่ 7–8) และผลจากนักวิเคราะห์ 2 คนได้ % RSD ของ MT และ corrected percentage area น้อยกว่า 3% ตามที่กำหนด⁽²⁰⁾

ปัจจัยอื่นที่อาจมีผลกระทบต่อวิธี คือ analytical kit เนื่องจากการวิเคราะห์แต่ละครั้งต้องเติมเจล (0.2% SDS gel buffer) ดังนั้นคุณภาพของเจลแต่ละรุ่นมักจะแตกต่างกันเล็กน้อย แต่อาจมีผลกระทบต่อความถูกต้องของผลวิเคราะห์ นอกจากนี้คุณภาพของแคปิลลารีก็มีความสำคัญต่อการแยกสารในการเกิดประจุที่สม่ำเสมอบนผนังด้านในของท่อ เมื่อทดลองเปลี่ยนเจลและท่อแคปิลลารีพบว่าสภาวะของวิธี CE-SDS นี้ มีความคงทน (ตารางที่ 3) ได้ค่า % RSD ของ MT และ corrected percentage area น้อยกว่า 3 โดยพบค่า MT ของ HC และ NGHC เมื่อเปลี่ยนแคปิลลารีจะให้ค่า % RSD มากกว่า 3 เพียงเล็กน้อย

เมื่อทดลองใช้สภาวะที่ศึกษานี้มาทดสอบตัวอย่างยา mAb ชนิด B และ C ซึ่งเป็น IgG1 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 140–155 kDa และมีน้ำตาลบนโมเลกุล HC (ภาพที่ 9–10) ผลการตรวจเอกลักษณ์โดยใช้สภาวะ non-reducing ได้ MT ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน และไม่พบ aggregates ใดๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ในสภาวะ reducing สามารถแยก HC ในรูป glycosylated HC ออกจาก NGHC ได้ ซึ่งมี MT ของ HC และ LC ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน จากการคำนวณปริมาณโมเลกุล monomer ของแอนติบอดี และผลรวมปริมาณ LC และ HC ของตัวอย่างทั้ง 2 พบว่ามีค่ามากกว่า 92% และ 95% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของยาทั้ง 2 ชนิด (specification) ที่ผู้ผลิตกำหนดไว้ในการขอขึ้นทะเบียนยา วิธี CE-SDS ที่กำหนดขึ้นนี้เป็นวิธีที่ใช้กับเครื่องอัตโนมัติ จึงมีความรวดเร็วสามารถวิเคราะห์โมเลกุลแอนติบอดีและตรวจสอบสารปนเปื้อนได้ภายในเวลา 30 นาที สามารถทำซ้ำได้มาก มีความผิดพลาดน้อย ตลอดจนประหยัดเวลาและแรงงานในการวิเคราะห์ นอกจากนี้

สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และตรวจหา NGHC แล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบยาค้ายคลึง (biosimilar) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับยาต้นแบบได้อีกด้วย⁽²¹⁾

สรุป

วิธี CE-SDS ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพการแยกสูง เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยา mAb ที่ใช้ในประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์ ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้แล้วเสร็จได้ด้วยงบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Roche. Biotechnology: new directions in medicine. 3rd ed. Basel: F. Hoffmann-La Roche Ltd; 2008.
2. Dubel S. Recombinant therapeutic antibodies. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 74(4): 723-9.
3. Shukla AA, Thommes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. Trends Biotechnol 2010; 28(5): 253-61.
4. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Annex 2: Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO technical report series No. 977. Geneva: World Health Organization; 2013. p. 51-89.
5. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Editors. Kuby immunology. 6th ed. New York: W.H. Freeman & Company; 2006. p. 85-9.
6. Mader SS. Antibody (IgG) structure. [online]. 1997; [cited 2014 Jun 13]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.mhhe.com/biosci/ap/dynamichuman2/content/lymphatic/visuals.mhtml>
7. Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. Trends Pharmacol Sci 2009; 30(7): 356-62.
8. Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol. [serial online] 2009; [cited 2014 Jun 13]; 20(6): 678-84. Available from: URL: http://pef.aibn.uq.edu.au/wordpress/wp-content/blogs.dir/1/files/Support/Purification/Literature/Pharmacological_significance_of_glycosylation_in_therapeutic_proteins-Li-2009.pdf
9. Hong P, Koza S, Bouvier ESP. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. J Liq Chromatogr Relat Technol 2012; 35(20): 2923-50.
10. Rustandi RR, Washabaugh MW, Wang Y. Application of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. Electrophoresis 2008; 29(17): 3612-20.
11. Note for guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (CPMP/ICH/365/96). London: European Medicines Agency; 1999.
12. The United States Pharmacopoeia 36 - The National Formulary 31. 31st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2013. p. 551, 605-9.

13. European Pharmacopoeia. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2011. p. 692-3.
 14. Lacher NA, Roberts RK, He Y, Cargill H, Kearns KM, Holovics H, et al. Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. *J Sep Sci* 2010; 33(2): 218-27.
 15. Felten C, Solano OS. Capillary electrophoresis in quality control: Part I: application for therapeutic proteins. [online]. 2008; [cited 2014 Jun 13]; [8 screens]. Available from: URL: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=B2010-11629.pdf>
 16. Salas-Solano O, Gennaro L, Felten C. Optimization approaches in the routine analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis. *LCGC Europe* 2008; 21(12): 615-23.
 17. Guo A, Camblin G, Han M, Meert C, Park S. Role of CE in biopharmaceutical development and quality control. In: Ahuja S, Jimidar MI, Editors. *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 357-99.
 18. Salas-Solano O, Tomlinson B, Du S, Parker M, Strahan A, Ma S. Optimization and validation of a quantitative capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate method for quality control and stability monitoring of monoclonal antibodies. *Anal Chem* 2006;78(18): 6583-94.
 19. Apostol L, Krull I, Kelner D. Analytical method validation for biopharmaceuticals. [online] 2013; [cited 2014 Jun 13]; [20 screens]. Available from: URL: <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/40718>
 20. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmeiderer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs* 2013; 27(5): 495-507.
-

Method validation of Capillary Electrophoresis–Sodium Dodecyl Sulfate for Identity and Purity analysis of Monoclonal Antibodies

Titaporn Pootipinyowat Wichuda Jariyapan and Saiwarul Jadoonkittinan

Institute of Biological Products, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Capillary electrophoresis–sodium dodecyl sulfate (CE–SDS) is a qualitative technique for protein analysis and is widely use for separation of protein by molecular size. This technique is increasingly applied to analysis of biotherapeutic products derived from biotechnology including monoclonal antibodies (mAbs). This study, validation of CE–SDS technique for identity and purity analysis of biotherapeutic products was performed by using Beckman PA 800, capillary bare–fused silica, SDS–MW Gel buffer with photodiode array (PDA) detector at wavelength 220 nm. The results showed that it has high resolution for detection of product – related impurity such as non–glycosylated heavy chain: NGHC. The obtained data has specificity and precision related to standard criteria as shown that the %RSD of migration time (MT) and corrected percentage area of light chain: LC, heavy chain: HC and NGHC were less than 3. The robustness was also determined by using new lot of SDS gel buffer and capillary in analysis. It's found that only %RSD of MT of HC and NGHC were slightly exceed 3 when using new capillary. This method was used to analyze 2 mAb samples, the results were correlated with results of standard material supported that CE–SDS is suitable technique for using as standard method for identity and purity analysis for quality control of marketed mAbs in Thailand.

Keywords: CE–SDS, monoclonal antibody, biotherapeutic products

คำร้อยละสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง ในการประเมินคุณภาพภายนอกระดับชาติของ ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกประเทศไทย พ.ศ. 2551-2556

สุภาวัลย์ ปิยรัตนวรสกุล และชมโฉล สันธูสาร

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์แห่งชาติโดยองค์การภายนอกด้านเคมีคลินิก จัดโดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพัฒนาและดำรงไว้ ซึ่งการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสากลอย่างต่อเนื่อง โครงการฯ ส่งน้ำเหลืองแห้งให้กับสมาชิกทั่วประเทศเพื่อวิเคราะห์ผล 15 รายการ จำนวน 3 รอบต่อปี รอบละ 2 ระดับ ประเมินผลการวิเคราะห์ที่รายงานผลกลับตามหลักการที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลก สมาชิกโครงการฯ จากปี 2551 ถึง 2556 เพิ่มขึ้นจาก 841 ราย เป็น 960 ราย ผลการตรวจวิเคราะห์ของสมาชิกที่ผิดปกติอย่างชัดเจน อยู่ระหว่างร้อยละ 1.5 ถึง 3.9 ค่าคะแนนดัชนีชี้วัดคุณภาพเฉลี่ยลดลงจาก 105 เป็น 80 คำร้อยละสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงที่ได้จากโครงการฯ แตกต่างจากค่าที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลก ระหว่าง -4.0 ถึง 2.3 และร้อยละสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงมีค่าลดลงและคงที่ ดังนี้ sodium = 2.4, potassium = 3.5, chloride = 3.6, glucose = 5.6, cholesterol = 5.7, total protein = 6.2, albumin = 6.5, uric acid = 6.7, blood urea nitrogen = 6.9, triglycerides = 9.0, creatinine = 9.6, alanine transaminase = 10.8, aspartate transaminase = 11.6, total bilirubin = 15.2 และ alkaline phosphatase = 19.8 แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่องของสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการ

Accepted for publication, 21 August 2014

INTRODUCTION

A medical laboratory or clinical laboratory or laboratory medicine is laboratory that provides accurate information about the health of an individual to diagnose, monitor and treat diseases, monitor patients' health and prevention of diseases.

Medical laboratory is generally divided into two sections: anatomic pathology and clinical pathology. Clinical chemistry is a section in clinical pathology that is generally concerned with analysis of components of blood urine and body fluids.

Clinical chemistry originated with the use of simple chemical tests. Subsequent to this, other techniques were applied. Most current laboratories are now highly automated to accommodate the high workload. Tests performed are closely monitored with quality controlled.

Quality control in clinical chemistry is the process that minimizes the variability of test performed, divided into two categories: Internal Quality Control (IQC) and External Quality Control (EQC). Other terms for external quality control are inter-laboratory comparisons, proficiency testing (PT) and external quality assessments schemes (EQAS).

A Thailand quality assessment in clinical chemistry program called National External Quality Assessment Scheme (NEQAS in Clinical Chemistry) was organized by the Bureau of Laboratory Quality Standards (BLQS), Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health in 1989. The main objectives of the NEQAS are to compare test results among the participating laboratories throughout the country by using the same test items including comparisons between the test results and the "target values" or the "assigned values" in the same kind of the test items as well as to encourage the quality system establishment and implementation by laboratory personnel to take action to complete Internal Quality Control (IQC) processes. The NEQAS in Clinical Chemistry provided by BLQS was accredited the competence to comply with ISO/IEC Guide 43-1:1997(E) and ILAC G13:2000 - Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes on December 11, 2006 and continuously accredited the competence to comply with the requirements of ISO/IEC 17043:2010; Conformity assessment - General requirements for proficiency Testing from National Association of Testing Authorities, Australia (NATA) on June 08, 2012.

MATERIALS AND METHODS

The Bureau of Laboratory Quality Standards (BLQS) invited the government and private laboratories throughout the country to participate in the NEQAS in Clinical Chemistry. The participating laboratories will apply to the NEQAS in Clinical Chemistry so as to receive the test items, 2 bottles of lyophilized samples, same or different levels of the test substances, 3 times per year. The test items are lyophilized serum in a 5.0 mL bottle, with the shelf life of at least 1 year, to be kept at 4°C to 8°C.

The total of 15 test substances in the NEQAS in Clinical Chemistry are glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, uric acid, total cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, total bilirubin, alanine transaminase, aspartate transaminase, alkaline phosphatase, sodium, potassium and chloride. These test items are carried out by BLQS to examine the homogeneity and stability test to ensure that they will not undergo any significant change throughout the conduct of the distribution.^(1, 2) The participating laboratories immediately performed all substance tests within one week after receiving the test items, reconstituted the test items exactly with 5.0 mL of distilled water and placed at room temperature for at least 30 minutes, gently mixed for homogeneity. Thorough mixing was made again before testing, and then completed testing of all test substances listed within the same day of reconstitution. All tests must be performed in the routine procedures, representing the real treatment for the patient's specimens, and reporting only single results with decimal numbers of test substances. The participants converted the results to the specified units if other test units were used. Specified test procedures and equipment in the report form for test results in Clinical Chemistry scheme must be sending to the NEQAS within the closing date. If the report form is delayed for the closing date, the test results will not be evaluated.

The coordinator of the NEQAS in Clinical Chemistry will assess the results of participants to examine the performance of laboratories by using the evaluation process with correspondence with the system recommended by the World Health Organization (WHO)⁽³⁾ and International Federation for Clinical Chemistry (IFCC).⁽⁴⁾ The participants who continuously return the complete report for NEQAS in Clinical Chemistry to the Bureau of Laboratory Quality Standards within the timescale of the closing date will be given certificates. The statistical parameter composed of designated value (DV), Variance Index Score (VIS), Mean Variance Index Score (MVIS), Overall Mean Running Variance Index Score (OMRVIS) with the steps of calculation or formulas are as follows:

Designated Value (DV)

Designated Value (DV) is the mean result of the participating laboratories for that method after excluding outliers more than 3 standard deviations from the mean. The calculated steps are

1. Calculating the mean (consensus mean, $\bar{X}_1$), standard deviation (SD_1) and coefficient of variation (CV_1) from test results;
2. Omitting the test results outside $\pm 3 SD_1$ (the outliers);
3. Recalculating the mean ($\bar{X}_2$), standard deviation (SD_2) and coefficient of variation (CV_2);
4. ($\bar{X}_2$) is used as the designated value (DV) for calculation of variance index scores.

Variance Index Score (VIS)

Variance Index Score (VIS) is positive (no negative value) and shows comparisons of results in each test, and has the value ranging from 0-400. The formula of VIS value is

$$VIS = \frac{X - DV}{DV} \times \frac{10,000}{CCV}$$

..... Formula I

X stands for test results from participants.

Chosen Coefficient of Variation (CCV)⁽⁵⁾ is shown in Table 1.

Table 1 Chosen coefficients of variation used for calculation of VIS of individual tests

Test substances	CCV	Test substances	CCV
Glucose	7.7	Blood Urea Nitrogen (BUN)	5.7
Creatinine	8.9	Uric acid	7.7
Total protein	3.9	Albumin	7.5
Total bilirubin	19.2	Aspartate transaminase (AST)	10.0*
Alanine transaminase (ALT)	10.0*	Alkaline phosphatase (ALP)	10.0*
Total cholesterol	7.6	Triglyceride	10.0*
Sodium	1.6	Potassium	2.9
Chloride	10.0*		

*Obtained value from the determinations during the first two years of the scheme

Mean Variance Index Score (MVIS)

Mean Variance Index Score (MVIS) has the value ranging from 0 to 400. MVIS value is positive (no negative value) and shows overall comparisons of test results from each test item or each trial. The calculated formula of Variance Index Score (VIS) is

$$VIS = \frac{X - DV}{DV} \times \frac{10,000}{CCV}$$

.....Formula II

Overall Mean Running Variance Index Score (OMRVIS)

Overall Mean Running Variance Index Score (OMRVIS) has the value ranging from 0-400 OMRVIS value is the mean of latest 30 VIS values in continuous backward sequence, positive (no negative value) and shows overall continuous comparisons of quality of each test item or each trial, is calculated from the formula:

$$OMRVIS = \frac{\sum VIS_{30}}{30}$$

.....Formula III

Acceptable scores for the quality standard performance

The acceptable scores for the quality standard performance for VIS, MVIS of each test and OMRVIS (overall performance) of the participants are equal to or less than 150.

RESULTS

At present to date, the NEQAS in Clinical Chemistry has continuously performed 148 trials for proficiency test of 15 general chemistry tests, 2 trials per cycle and 3 cycles per year.

The NEQAS in Clinical Chemistry has provided applications to the clinical chemistry laboratories in the country. The number of participants was 841 laboratories in 2008 and 960 laboratories in 2013. They were divided by general hospitals and community health hospitals, private hospitals including polyclinics, and others from university hospitals, military hospitals, state enterprise service hospitals, and bangkok metropolitan hospitals as shown the percent distribution of participants (Table 2).

Table 2 The percent of participant laboratories distribution throughout the country, applied to the NEQAS in Clinical Chemistry from year 2008 to 2013

↓ Participating Laboratories	Year →	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
general hospitals and community health hospitals		73.01	71.93	72.04	73.32	71.88	70.00	72.03
private hospitals and polyclinics		21.28	22.97	22.04	20.42	22.58	23.54	22.14
university hospitals		2.50	1.74	1.90	2.20	1.95	2.08	2.06
military hospitals		2.38	2.55	3.20	3.25	2.82	3.54	2.96
state enterprise service hospitals, and bangkok metropolitan hospitals		0.83	0.81	0.83	0.81	0.76	0.83	0.81
Total		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

The average MVIS of participating laboratories decreased from the value of 105 to 80 as (Figure 1). About 16% of participants indicated the very good quality results. It was found that the MVIS 0-50 and 50% of participants indicated the good quality MVIS 51-100 while 24% of participants were at medium quality results. It was found that the MVIS 101-150 and 10% of participants were unacceptable quality results, MVIS more than 151 (Table 3).

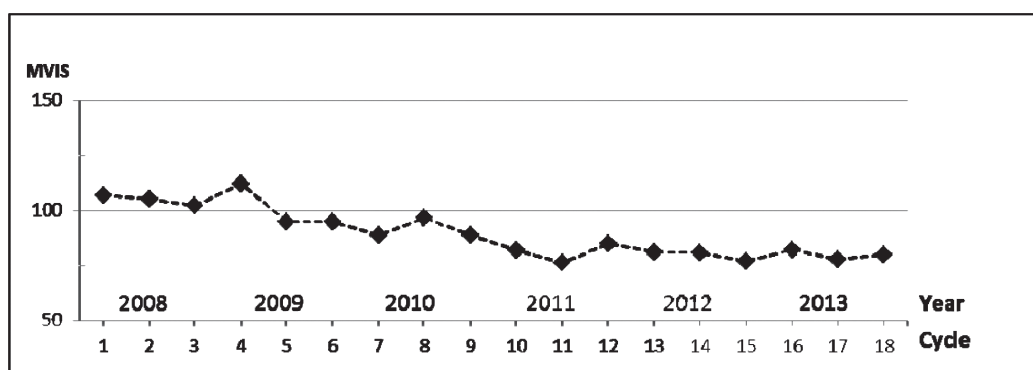


Figure 1 MVIS of 15 general chemistry tests from participants Thailand NEQAS in Clinical Chemistry: 2008–2013

Table 3 Percent (average) of the laboratories according to MVIS level of Thailand NEQAS in Clinical Chemistry: 2008–2013

↓ MVIS level	Years →	Percent (average) of the laboratories						average
		2008	2009	2010	2011	2012	2013	
0–50		8.3	8.8	11.2	24.4	22.1	21.6	16.1
51–100		44.7	48.5	52.6	46.3	54.7	55.2	50.3
101–150		31.7	29.4	25.6	19.2	17.8	18.1	23.6
151–200		10.3	9.4	7.7	8.5	4.2	3.8	7.3
201–250		3.0	2.8	2.2	0.7	0.8	0.8	1.7
251–300		1.0	0.9	0.4	0.2	0.2	0.4	0.5
301–350		1.0	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3
351–400		0.0	0.1	0.1	0.5	0.0	0.1	0.2

The evaluation system used in this scheme is the system recommended by the World Health Organization and International Federation for Clinical Chemistry. The first step is the omitting of the outliers (mean $\pm$ 3 SD) then to calculate the Designated Value (DV). The percent outliers (average) of 15 test substances which were omitted from the participants range from 1.5% to 3.9% (Table 4).

Figure 2 shows the percent CV of 15 analyses from participants Thailand NEQAS in Clinical Chemistry from the year 2008 to 2013. It is clearly shown that the % CV during the last three years (2011 to 2013) from the results of the scheme was consistently continuous, except the results of aspartate transaminase slightly upward trend in the last year (2013).

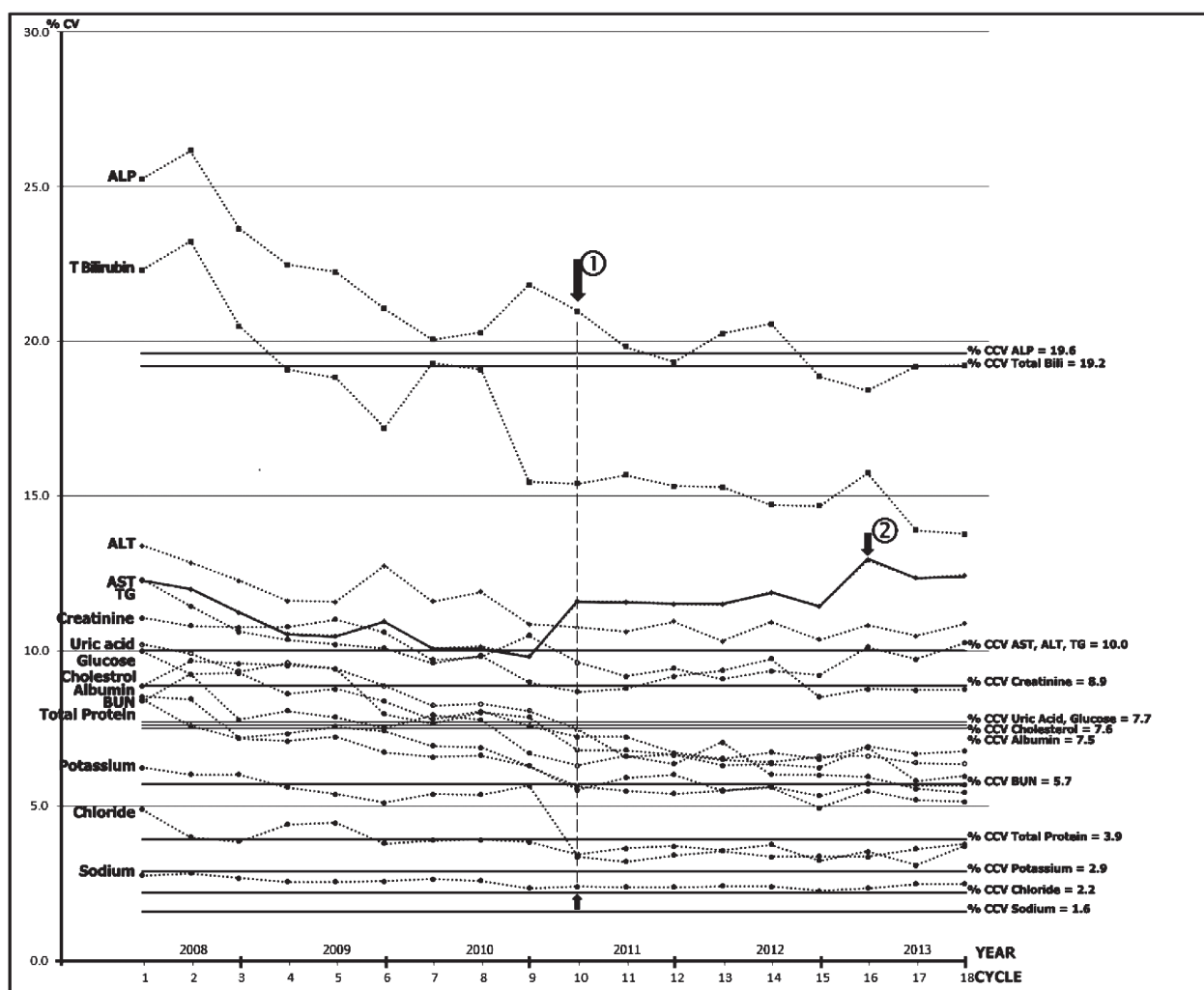


Figure 2 Percent CV of 15 general chemistry tests from participants Thailand NEQAS in Clinical Chemistry: 2008–2013

Table 4 Percent outliers (average) of 15 test substances reported by participants of Thailand NEQAS in Clinical Chemistry: 2008-2013

Test substances	Number of result and % Outliers	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Glucose	Number of result	725	737	752	787	817	839
	%Outliers	2.7	2.7	3.0	2.7	2.6	2.4
BUN	Number of result	774	777	784	813	840	856
	%Outliers	3.2	2.7	3.3	2.7	2.8	2.5
Creatinine	Number of result	772	781	784	814	840	855
	%Outliers	2.3	2.2	2.0	2.4	2.3	2.0
Uric Acid	Number of result	765	772	775	807	834	850
	%Outliers	3.3	2.9	2.7	3.6	3.2	3.6
Total Protein	Number of result	720	723	730	762	793	811
	%Outliers	2.8	2.4	2.7	3.0	2.3	3.5
Albumin	Number of result	722	729	736	769	796	814
	%Outliers	2.6	2.2	2.6	3.3	3.4	3.4
Total Bilirubin	Number of result	722	728	736	765	791	808
	%Outliers	3.3	3.6	2.4	3.4	2.5	2.9
Aspartate transaminase	Number of result	763	771	779	808	838	850
	%Outliers	3.4	2.9	3.2	2.9	1.9	1.7
Alanine transaminase	Number of result	763	772	779	808	836	850
	%Outliers	3.3	2.6	2.9	3.0	2.6	2.9
Alkaline phosphatase	Number of result	747	759	767	800	828	841
	%Outliers	1.9	2.2	1.8	1.9	2.7	2.9
Cholesterol	Number of result	756	753	771	811	838	852
	%Outliers	3.0	2.8	2.9	2.9	2.5	2.6
Triglyceride	Number of result	757	772	773	809	836	848
	%Outliers	2.6	3.0	2.4	3.2	2.5	2.7
Sodium	Number of result	594	624	664	717	746	762
	%Outliers	2.8	2.9	2.5	2.5	2.3	1.8
Potassium	Number of result	625	644	672	723	754	767
	%Outliers	3.9	3.0	2.7	2.1	1.6	1.5
Chloride	Number of result	597	624	664	714	745	761
	%Outliers	1.5	2.0	2.3	2.5	2.1	1.9

The NEQAS in Clinical Chemistry reported the new %CCV from the determinations during the last three years of the scheme, 2011–2013 except the results of aspartate transaminase (AST) from 2011–2012 as shown in Table 5. The difference of the %CV (average) calculated from 15 test substances of the participants from the %CCV recommended by WHO range from -4.0 (the %CV of total bilirubin is less than the %CCV: 19.2–15.2) to 2.3 (the %CV of total protein is more than the %CCV: 6.2–3.9). The percent CV from NEQAS of Clinical Chemistry Laboratory in Thailand are significant difference (95% Confidence Interval) from the %CCV recommended by WHO, except alkaline phosphatase (ALP).

Table 5 New %CCV from the determination during the last three years of the scheme, 2011–2013 except Aspartate transaminase from 2011–2012

Test substances	% CV	% CCV	Difference	P value	95% Confidence Interval of the Difference	
	NEQAS	WHO			Lower	Upper
Total Bilirubin	15.2	19.2	-4.0**	.000	-4.73	-3.31
Glucose	5.6	7.7	-2.1**	.000	-2.46	-1.84
Cholesterol	5.7	7.6	-1.9**	.000	-2.18	-1.72
Triglyceride	9.0	10.0*	-1.0**	.000	-1.28	-0.66
Albumin	6.5	7.5	-1.0**	.000	-1.33	-.59
Uric Acid	6.7	7.7	-1.0**	.000	-1.31	-5.7
ALP	19.8	19.6	0.2	.555	-.48	.84
Potassium(K)	3.5	2.9	0.6**	.000	.47	.80
Creatinine	9.6	8.9	0.7**	.001	.40	1.02
ALT	10.8	10.0*	0.8**	.000	.53	1.00
Sodium (Na)	2.4	1.6	0.8**	.000	.78	.87
BUN	6.9	5.7	1.2**	.000	.92	1.46
Chloride(Cl)	3.6	2.2	1.4**	.000	1.10	1.62
AST	11.6	10.0*	1.9**	.000	1.40	1.77
Total Protein	6.2	3.9	2.3**	.000	1.934	2.727

* Obtained value from the determinations during the first two years of the scheme

** Significant difference (95% Confidence Interval)

DISCUSSION

The NEQAS in Clinical Chemistry is the large external quality control scheme, where the submitted results grouped by the principle of analysis were at least 100 participants. The percent of overall trimming ranging from 1.5% to 3.9% shown in Table 4 were less than 10% which can be used routinely (6). The performance of different laboratories is assessed by the statistical parameters that calculated using these trimmed results; it is clear that such an index will not be distorted by any outlying value.

The variance index score (VIS) shows comparisons of results in each test and has the value ranging from 0-400, calculated using formular I through the chosen coefficient of variation (CCV) shown in Table 1, accepted the CCV of aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, triglyceride and chloride which were obtained during the first two years of the NEQAS.

The improvement in the performance of laboratories can be detected by the average MVIS of participating laboratories deceased from the value of 105 to 80 as shown in Figure 1. About 16% of participants had very good quality MVIS of 0-50 and 50% at good quality MVIS of 51-100 as shown in Table 3.

The NEQAS in Clinical Chemistry reported the new %CCV from the determinations during the last three years of the scheme, 2011-2013 except aspartate transaminase that from 2011-2012 as shown in Table 5.

The difference of the %CV (average) of 15 test substances of the participants from the %CCV recommended by WHO, range from -4.0 (the %CV of total bilirubin is less than the %CCV: 19.2-15.2) to 2.3 (the %CV of total protein is more than the %CCV: 6.2-3.9).

CONCLUSION

The NEQAS in Clinical Chemistry reported the new percent coefficient of variation of sodium = 2.4, potassium = 3.5, chloride = 3.6, glucose = 5.6, cholesterol = 5.7, total protein = 6.2, albumin = 6.5, uric acid = 6.7, BUN = 6.9, triglyceride = 9.0, creatinine = 9.6, alanine transaminase = 10.8, aspartate transaminase = 11.6, total bilirubin = 15.2 and alkaline phosphatase = 19.8. The %CV of 15 tests obtained during the last three years were constantly kept, showing the performance improvement of participating laboratories of Thailand NEQAS in clinical chemistry.

The NEQAS in Clinical Chemistry, Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health managed the proficiency test from ISO/IEC Guide 43-1:1997 and was accredited for the facility complied with ILAC G13:2000 - Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes on December 11, 2006 and accredited the facility complied with the requirements of ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment - General requirements for proficiency testing from National Association of Testing Authorities, Australia (NATA) on June 08, 2012.

The main objectives are not only to compare test results among the participating laboratories throughout the country but also to encourage the quality system establishment and implementation by laboratory personnel to take action to complete of Internal Quality Control (IQC) processes, as well as to boost up laboratory services to improve and maintain sustainable quality monitoring leading to the international standards.

REFERENCES

1. International Organization for Standardization. ISO 13528:2005 (E), Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva: ISO; 2005.
2. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17043:2010 (E). Conformity assessment--General requirements for proficiency testing. Geneva: ISO; 2010.
3. World Health Organization. Health laboratory services in support of primary health care in developing countries. New Delhi: WHO; 1994.
4. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Fundamentals for External Quality Assessment (EQA). Guidelines for improving analytical quality by establishing and managing EQA schemes. Examples from basic chemistry using limited resources [online].1996. [45 screens]. Available from: URL: <http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/Fundamentals-for-EQA.pdf>.
5. Whitehead TP. Assessing the analytical quality of the clinical laboratory. Pure & Apply Chem 1980; 52: 2485-94.
6. Healy MJR. Outliers in clinical chemistry quality-control schemes. Clin Chem 1979; 25(5): 675-7.

The Percent CCV From National External Quality Assessment of Clinical Chemistry Laboratory in Thailand, 2008–2013 Experience

Supawan Piyaratanavarasakul and Chomchilai Sinthusarn

Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT A Thailand National External Quality Assessment scheme (NEQAS) in Clinical Chemistry was organized by the Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. The objectives were to improve and maintain the sustainable quality monitoring leading to the international standards. The test items: 2 lyophilized samples were distributed to the participants throughout the country, 3 cycles per year. The returned reports from participants were grouped by the principle of analysis and evaluated by the system as recommended by the World Health Organization. In 2013, the NEQAS continuously performed 148 trials for 15 general chemistry tests from 960 laboratories throughout the country. From the year 2008 to 2013, the outlier results that were omitted range from 1.5% to 3.9% of participant results. The average MVIS of participating laboratories decreased from 105 to 80. The %CV of the participants and the %CCV recommended by WHO, differed from -4.0 to 2.3. The NEQAS reported the % CV of sodium = 2.4, potassium = 3.5, chloride = 3.6, glucose = 5.6, cholesterol = 5.7, total protein = 6.2, albumin = 6.5, uric acid = 6.7, blood urea nitrogen = 6.9, triglyceride = 9.0, creatinine = 9.6, alanine transaminase = 10.8, aspartate transaminase = 11.6, total bilirubin = 15.2 and alkaline phosphatase = 19.8. Furthermore, the %CV of 15 tests obtained during the last three years were found consistent thus indicating the improvement of participating laboratories and maintenance of the sustainable quality in clinical chemistry.

Keywords: NEQAS, National External Quality Assessment scheme, laboratory, %CCV, percent chosen coefficient of variation, clinical chemistry

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Apichai Mongkol	Jureporn Boonyawongvirot
	Varunee Jinaratana	Wanchai Sattayawuthipong
Technical Advisor	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
	Panadda Silva	
Editor	Yaowapa Pongsuwanna	
Editorial Board	Somchai Bovornkitti	Prasert Auewarakul
	Orasa Suthienkul	Pilaipan puthavathana
	Aree Thattiyaphong	Jurai Chotichanathawewong
	Siri Srimanoroth	Usavadee Thavara
	Kanokporn Atisook	Wichuda Jariyapan
	Suthon Vongsheree	Malinee Chittaganpitch
	Suwanna Tienungoon	Siripakorn Sangkitporn
	Wimol Petkanchanapong	Prapai Wongsinkongman
	Charoendee Pingsuthiwong	Walailuk Matapatara
	Areerat Sa-ngasang	
Secretary	Paiwan Boonwong	
Administration	Namfon Noiprasert	
	Prasan Julwong	
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Aroonkarnphim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย จับไวบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th